

HANNA DURSO NEVES CAETANO

**A SUBFAMÍLIA SNAC-A (ATAF) EM PLANTAS: POSSÍVEIS
COMPONENTES A JUSANTE DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE
MORTE CELULAR MEDIADA POR PROTEÍNAS NRP/DCDs**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

C128s
2018

Caetano, Hanna Durso Neves, 1994-
A subfamília SNAC-A (ATAF) em plantas : possíveis componentes a jusante da via de sinalização de morte celular mediada por proteínas NRP/DCDs / Hanna Durso Neves Caetano. - Viçosa, MG, 2018.
vii, 52 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Elizabeth Pacheco Batista Fontes.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 46-52.

1. *Arabidopsis thaliana*. 2. Morte celular. 3. *Arabidopsis thaliana* - Efeito do stress. 4. Reticulo endoplasmático. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.


CDD 22. ed. 583.64


HANNA DURSO NEVES CAETANO


A SUBFAMÍLIA SNAC-A (ATAF) EM PLANTAS: POSSÍVEIS COMPONENTES A JUSANTE DA VIA DE SINALIZAÇÃO DE MORTE CELULAR MEDIADA POR PROTEÍNAS NRP/DCDs

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 26 de julho de 2018.


Pedro Augusto Braga dos Reis
(Coorientador)


Anésia Aparecida dos Santos


Elizabeth Pacheco Batista Fontes
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador e consumidor da vida, o Único digno de todo louvor, honra e glória. Aquele que sustenta e supre todas as necessidades. Por seu amor e graça incompreensíveis;

Aos meus pais, pelo suporte, amor incondicional, por serem sempre um porto seguro nos momentos difíceis;

À minha família, em especial meus irmãos Fernandinho, Lucas, Matheus e Débora, pelo incentivo, conselhos, companhia e amizade;

Ao meu noivo, Vitor, que tem me acompanhado em toda essa caminhada, pelo carinho, paciência e companheirismo;

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade e infraestrutura fornecidas para minha formação profissional;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

À minha orientadora, Elizabeth Fontes, pela oportunidade e confiança. Pelo conhecimento passado e auxílio para a concretização desse trabalho;

Ao meu co-orientador, Pedro Augusto, que participou ativamente ao longo de todo trabalho, pelo auxílio e dedicação;

Aos amigos do LBMP, por serem sempre tão prestativos. Por tornarem o ambiente de trabalho mais alegre e muito mais leve, sem vocês as horas de trabalho com certeza seriam mais longas. Em especial ao Luiz, pelo auxílio e disposição em aconselhar e ajudar;

Ao “Cleysinho” e Otávio, pelo auxílio nas análises de bioinformática e estatísticas, pelas dicas e apoio;

À Gláucia e Marlene por toda a colaboração;

À família IPV, por me acolher em Viçosa;

A todos aqueles que torceram por mim ao longo dessa caminhada e contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Fatores de transcrição NAC.....	3
2.2. UPR e via de morte celular mediada por proteínas NRP/DCDs	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1. Análises de bioinformática	10
3.1.1. Análises filogenéticas	10
3.1.2. Matriz de identidade de sequência.....	10
3.2. Material vegetal	11
3.2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
3.2.2. Soja	11
3.3. Clonagem dos genes <i>AtATAF1</i> e <i>AtATAF2</i>	11
3.4. Ensaio de transativação em leveduras	12
3.5. Ensaio de interação proteína-proteína pelo sistema duplo-híbrido de leveduras .	13
3.6. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	14
3.7. Verificação de localização subcelular de <i>AtATAF1</i> e <i>AtATAF2</i>	14
3.8. Estresse em soja.....	14
3.9. Estresse em plântulas de <i>Arabidopsis</i>	15
3.10. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	16
3.11. Ensaio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	16
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. Análise <i>in silico</i> da subfamília SNAC-A (ATAF) pertencente a superfamília de NACs	20
4.2. Os componentes da subfamília SNAC-A (ATAF) de soja são induzidos por múltiplos estresses	28
4.3. O fator de transcrição <i>ATAF1</i> não interage com <i>ANAC036</i> pelo sistema de duplo-híbrido em leveduras	34
4.4. <i>ATAF1</i> pode ser um inibidor da via de morte celular mediada por NRPs	38
4.5. <i>ATAF2</i> como possível componente da via de morte mediada por NRPs	41
5. CONCLUSÃO	44
6. BIBLIOGRAFIA	46

RESUMO

CAETANO, Hanna Durso Neves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2018. **A subfamília SNAC-A (ATAF) em plantas: possíveis componentes a jusante da via de sinalização de morte celular mediada por proteínas NRP/DCDs.** Orientadora: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Coorientadores: Pedro Augusto Braga dos Reis e Juliana Rocha Lopes Soares Ramos.

A via de sinalização de morte celular mediada por proteínas NRP/DCDs foi primeiramente descrita em soja como uma via integrativa de resposta a múltiplos estresses. A falta de ferramentas moleculares adequadas à caracterização dessa via em soja levou ao estudo de sua conservação em espécies modelo. Em *Arabidopsis*, os membros da via foram descritos, no entanto não foi definido o ortólogo do gene *GmNAC30*. Neste trabalho, foi conduzida uma análise *in silico* da subfamília SNAC-A (ATAF), à qual pertence *GmNAC30*, demonstrando ser ela amplamente distribuída no reino vegetal. Em comparação com *Arabidopsis*, foi verificada uma expansão dessa subfamília em soja, o que pode estar relacionado à pressão seletiva que espécies cultiváveis sofrem a favor da manutenção de genes capazes de conferir tolerância a estresses. Consistente com essa ideia, a análise da expressão de alguns membros desse subgrupo em soja demonstrou que todos eles respondem a múltiplos estresses. Os genes duplicados da subfamília SNAC-A em soja exibiram padrão e cinética de indução por polietilenoglicol (PEG) e Tunicamicina (TUN) similares; porém, os pares apresentaram diferenças sutis de indução por AS, indicando que devem possuir funções parcialmente sobrepostas, mas não absolutamente idênticas. A fim de verificar a hipótese difundida de ser *ATAF1* o ortólogo de *GmNAC30* foram realizados ensaios de interação de *ATAF1* com *ANAC036* (ortólogo de *GmNAC081*) pelo sistema de duplo-híbrido de leveduras e análises de expressão gênica de *ATAF1* em resposta a estresses osmótico e no retículo endoplasmático (RE). Os resultados obtidos, no entanto, indicaram não ser *ATAF1* o ortólogo de *GmNAC30*, uma vez que não interagiu com *ANAC036* pelo sistema de duplo-híbrido, e ao contrário de *GmNAC30*, não foi induzido por tunicamicina (TUN), embora, assim como *GmNAC30*, *ATAF1* tenha exibido atividade transcricional pelo sistema de mono-híbrido de leveduras. Uma possível interação do gene *ATAF1* com a via de morte celular induzida por estresses no RE e osmótico foi avaliada por genética reversa no mutante *ataf1-2* que exibiu 75% de redução na expressão de *ATAF1*. Tanto a expressão basal quanto a expressão induzida por PEG e TUN dos genes *NRP-1* e *ANAC036*,

componentes da via de morte celular, foi superior no mutante *ataf1-2* do que em Col-0, implicando ATAF1 como possível regulador negativo da via de morte celular mediada por NRPs. Sendo *ATAF2* um outro membro do subgrupo SNAC-A que está filogeneticamente muito próximo a *GmNAC30*, foi avaliada a sua resposta a tratamentos com PEG e tunicamicina em plântulas das linhagens Col-0 e *ataf1-2*. Foi observada a indução de *ATAF2* em resposta a ambos os estresses, sendo que a indução é aumentada no mutante *ataf1-2*, consistente com o perfil de expressão gênica de integrantes da via de morte celular mediada por NRPs. Coletivamente, estes resultados substanciam o argumento de que *ATAF2* possa ser ortólogo de *GmNAC030*. No entanto, experimentos complementares são necessários para a confirmação dessa hipótese.

ABSTRACT

CAETANO, Hanna Durso Neves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2018. **The SNAC-A (ATAF) subfamily in plants: possible downstream components of the NRP/DCDs-mediated cell death signaling.** Adviser: Elizabeth Pacheco Batista Fontes. Co-advisers: Pedro Augusto Braga dos Reis and Juliana Rocha Lopes Soares Ramos.

The NRP/DCDs- mediated cell death signaling was first described in soybean as an integrative pathway for multiple stresses. The lack of adequate molecular tools for characterization of this pathway in soybean led to the demonstration of its conservation in plant model systems. In Arabidopsis, several members of this family have been described, but the *GmNAC30* ortholog remains to be identified. In this investigation, an in silico analysis of the SNAC-A (ATAF) subfamily of GmNAC30 was conducted and demonstrated that SNAC-A is largely distributed in the plant kingdom. As compared to Arabidopsis, the SNAC-A subfamily was expanded in soybean, more likely due to the selective pressure undergone by economically relevant crops towards the maintenance and duplication of stress related genes. Accordingly, an expression analysis of some soybean genes of this subfamily demonstrated that they respond to multiple stresses. The duplicated genes from the soybean SNAC-A subfamily displayed similar profile and induction kinetics by PEG and tunicamycin (TUN). Nevertheless, the pairs exhibited slightly differences in salicylic acid (SA) induction, indicating that they may display partially overlapping, but not absolutely identical functions. To confirm that *ATAF1* is a *GmNAC30* ortholog, yeast two-hybrid assays for ATAF1-ANAC036 (GmNAC081 ortholog) interaction and analysis of ATAF1 gene expression in response to osmotic and endoplasmic reticulum (ER) stresses were conducted. However, the results indicated that *ATAF1* is not likely a *GmNAC30* ortholog, as ATAF1 did not interact with ANAC036 in yeast and, opposing to the *GmNAC30* expression profile, it was not induced by TUN, although like GmNAC30, ATAF1 was transcriptionally active by the yeast mono-hybrid assay. A possible interaction of *ATAF1* with the ER stress- and osmotic stress-induced cell death signaling was monitored by reverse genetic in *ataf1-2* mutant, which displayed a 75% reduction in the accumulation of *ATAF1* transcripts. Both basal and stress-induced expressions of *NRP-1* and *ANAC036*, components of the cell death pathway, were higher in *ataf1-2* than in Col-0, implicating ATAF1 as a possible negative regulator of the NRPs-mediated cell death signaling. Because *ATAF2* is another member of the SNAC-A

subfamily, which is phylogenetically close related to *GmNAC30*, its response to PEG and TUN was monitored in Col-0 and *ataf1-2* seedlings. *ATAF2* was induced by both treatments and the transcript accumulation was further increased in *ataf1-2*, which was consistent with the expression profile of components of the NRPs-mediated cell death signaling. Collectively, these results substantiate the argument that *ATAF2* may be a *GmNAC030* ortholog. However, complementary experiments are necessary to confirm this hypothesis.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como um país que tem a economia pautada essencialmente no agronegócio. Deste modo, o estudo da fisiologia dos vegetais frente às condições de cultivo e estresses ambientais, devido a sua importância para a melhoria da produtividade e manejo de culturas, se apresenta como um tema de grande relevância econômica.

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018), a soja é uma das culturas agrícolas brasileiras mais rentáveis. Com um cultivo de cerca de 35,1 milhões de hectares e correspondendo a aproximadamente 57% da área plantada em grãos do país, estima-se uma produção de cerca de 118 milhões de toneladas de soja para a safra de 2017/18, com uma receita bruta estimada em 142,64 bilhões de reais para essa safra.

As plantas, como organismos sésseis, são expostas constantemente a condições ambientais adversas, que incluem estresses abióticos, como extremos de temperatura, salinidade e déficit hídrico, além de estresses bióticos (causados por microorganismos, herbívoros ou vírus). Conseqüentemente, as plantas devem ser capazes de se adaptarem às mudanças das condições ambientais a fim de sobreviverem, sendo que a integração de respostas a estresses é determinante quanto à susceptibilidade ou tolerância destas plantas às situações adversas.

A ativação de vias de sinalização com conseqüente superexpressão e/ou repressão de genes específicos se caracteriza como uma das formas utilizadas pelas plantas para lidar com o estresse, de forma a minimizar seus efeitos deletérios na célula (REIS *et al.*, 2016; TWENEBOAH e OH, 2017). Assim sendo, a fim de desenvolverem culturas agrônomicas superiores, se torna essencial a compreensão dos sistemas de sinalização utilizados pelas plantas em resposta ao estresse e suas implicações para a célula. Destacam-se aqui os fatores de transcrição (TF) como importantes alvos moleculares para estudos de engenharia genética, visto que os sistemas de resposta de um modo geral se utilizam dos TF como intermediários efetores (GAHLAUT *et al.*, 2016).

A via de sinalização de morte celular mediada por proteínas NRP/DCDs (*N-rich proteins-developmental cell death domain*) foi primeiramente descrita em soja como uma via integrativa de resposta a múltiplos estresses, incluindo os estresses no retículo endoplasmático e osmótico, pelos quais ela é sinergicamente ativada (IRSIGLER *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2008). Dentre os componentes já descritos desta via, destacam-se os fatores de transcrição NAC, GmNAC081 e GmNAC30, que atuam em conjunto para

ativar a expressão de VPE (*vacuolar processing enzyme*), responsável por executar o processo de morte celular mediado pelo colapso do vacúolo (MENDES *et al.*, 2013).

Recentemente, foi mostrado que a via de sinalização mediada por NRP/DCD também propaga sinais de morte celular induzido por estresse em outras espécies vegetais, tendo sido demonstrado, em *Arabidopsis*, a equivalência de função entre alguns dos ortólogos dos componentes da via a seus pares em soja (REIS *et al.*, 2016). No entanto, ainda não foi descrito em *Arabidopsis* o TF que exerceria a função do importante componente da via GmNAC30. Esse fator de transcrição pertence a subfamília SNAC-A (ATAF) da superfamília NAC em soja (MELO, 2016). Análises *in silico* indicam *AtATAF1* como ortólogo de *GmNAC30* (SILVA *et al.*, 2015), embora, mais recentemente, indícios apontem para *AtATAF2* como o possível ortólogo de *GmNAC30* (MELO, 2016). Obviamente, estudos funcionais precisam ser realizados a fim de comprovar a equivalência de função entre essas proteínas.

A via de sinalização de morte celular mediada por proteínas NRP/DCDs, por operar através de mecanismos regulatórios conservados entre as diferentes espécies de planta, e dado o seu papel integrativo a múltiplos estresses, se apresenta como um potencial alvo de estudos para o desenvolvimento de culturas agronômicas tolerantes à estresses. No entanto, a dificuldade de se encontrarem ferramentas moleculares eficazes em soja tem comprometido o avanço na caracterização da via nesta espécie, levantando a necessidade de se trabalhar com organismos modelos. Sendo assim, o presente trabalho propõe-se investigar a participação de *AtATAF1* e *AtATAF2* como possíveis integrantes da via de morte celular programada mediada por NRPs, desvendando-se assim mais uma peça que compõe a via em *Arabidopsis thaliana*. Além disso, propõe-se analisar *in silico* e caracterizar molecularmente os componentes da subfamília SNAC-A (ATAF) de soja.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fatores de transcrição NAC

Uma ampla gama de genes é ativada em condições de estresse, os quais podem ser classificados em dois grupos, os genes funcionais e os genes regulatórios. O primeiro grupo contém genes codificando proteínas relacionadas diretamente ao metabolismo. O segundo grupo, por outro lado, codifica os fatores de transcrição (TFs), que irão atuar individual ou coletivamente, em redes transcricionais, para a regulação de genes responsivos ao estresse (TRAN *et al.*, 2010).

Os fatores de transcrição, em conjunto com as regiões cis-regulatórias em que se ligam, atuam como chaves transcricionais, representando componentes críticos da regulação gênica de quase todos os processos celulares (PURANIK *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2016). No genoma de plantas, cerca de 6-10% dos genes codificam TFs, sendo que os domínios de ligação ao DNA destes TFs são altamente conservados entre as espécies, o que permite classificá-los em famílias (GAHLAUT *et al.*, 2016). Mais de 50 famílias de fatores de transcrição já foram identificadas em plantas por meio de análises de sequência em espécies modelo como *Arabidopsis thaliana* e arroz (NURUZZAMAN *et al.*, 2010). Dentre essas, existem aquelas exclusivas de plantas, das quais a família dos TFs NACs (acrônimo para NAM, ATAF e CUC) se destaca como uma das maiores e mais amplas, exibindo uma alta plasticidade de respostas a sinais de estresses ou de desenvolvimento (WANG *et al.*, 2016).

Estruturalmente, as proteínas NACs são compostas basicamente por um domínio N-terminal conservado que possui aproximadamente 150 aminoácidos e a capacidade de ligação ao DNA (DB) - domínio NAC - além de uma região C-terminal variável, a qual é responsável pelas diferentes funções regulatórias das proteínas NAC, tendo assim a função de regulação transcricional (TR) [Figura 1 (i)] (GAHLAUT *et al.*, 2016). Entretanto, têm sido identificadas proteínas NACs com algumas variações estruturais [Figura 1 (ii-vi)], que podem codificar apenas o domínio NAC; dois domínios NAC repetidos em tandem; genes SOG1 com extensões N-terminais precedendo o domínio NAC; e proteínas VOZ (*vascular plant one-zinc finger*), que são compostas por um domínio dedo de zinco de ligação ao DNA e um domínio NAC em sua região C-terminal, além de um domínio TR em sua região N-terminal (JENSEN *et al.*, 2010; PURNIK *et al.*, 2012). Além dessas variações, sabe-se também que, em alguns TFs NACs, é possível

encontrar um motivo transmembrana α -helicoidal na região C-terminal dessas proteínas o qual é responsável pelo ancoramento destas na membrana plasmática ou do retículo endoplasmático (KIM *et al.*, 2007).

O domínio NAC é composto de 5 subdomínios (A-E). Os subdomínios C e D são altamente conservados e carregados positivamente, sendo responsáveis pela ligação ao DNA. O subdomínio A, por outro lado, pode estar envolvido na formação de um dímero funcional, enquanto os subdomínios mais divergentes B e E podem ser responsáveis pela diversidade funcional de genes NACs (PURNIK *et al.*, 2012). Além disso, sabe-se que a subunidade D de alguns domínios NACs pode também conter um domínio de regulação negativo (NRD) altamente hidrofóbico, o qual reprime a atividade transcricional [Figura 1 (ii)] (PURNIK *et al.*, 2012).

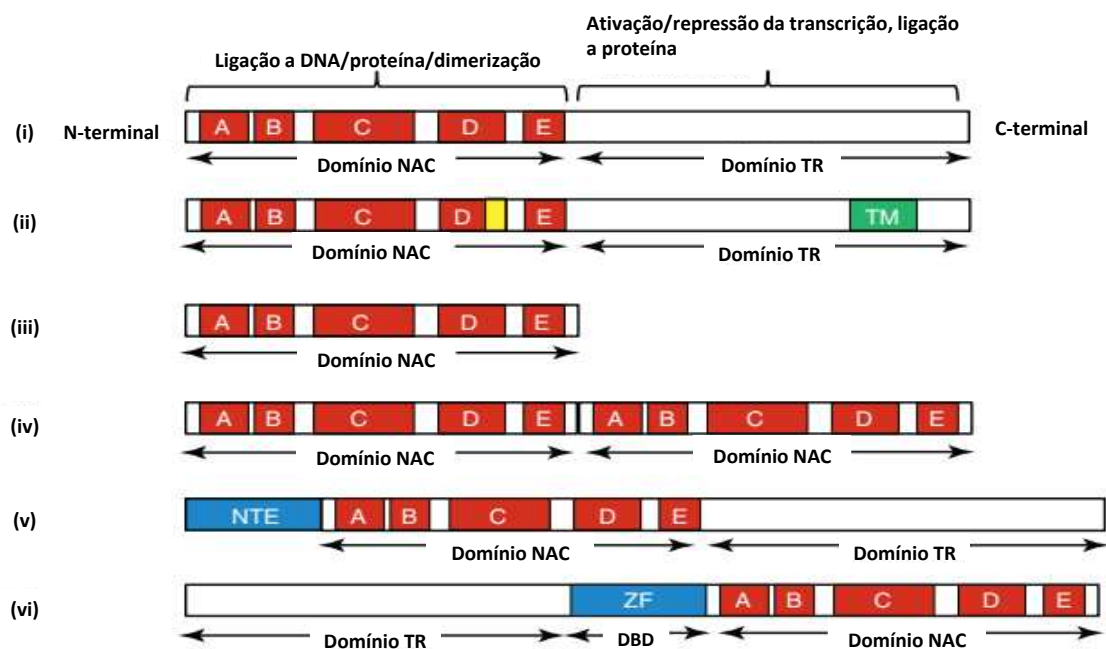


Figura 1. Estrutura de proteínas NAC. Representação esquemática mostrando (i) uma típica proteína NAC com um domínio NAC altamente conservado na região N-terminal, o qual é subdividido em cinco subdomínios conservados (A-E; mostrados em vermelho). Essa região possui a capacidade de ligação ao DNA (DB) e/ou é responsável pela ligação e dimerização de proteínas. A região C-terminal é mais divergente e serve como um potencial domínio de regulação transcricional (TR) que possui função ativadora ou repressora e pode às vezes possuir atividade de ligação a proteínas. (ii) Em alguns casos, o domínio NAC pode conter um domínio regulatório negativo (amarelo) e a região C-terminal pode ter um motivo transmembrana (verde). Variações de proteínas NAC típicas incluem aquelas que codificam (iii) apenas o domínio NAC, (iv) dois domínios NAC repetidos em tandem, (v) uma região N-terminal estendida (NTE) precedendo o domínio conservado NAC e (vi) proteínas VOZ, em que o domínio NAC está na região C-terminal e o domínio TR está na região N-terminal com um motivo dedo de zinco (ZF) funcionando como um domínio DB conservado (PURANIK *et al.*, 2012).

Representados por pelo menos 151 membros em *Oryza sativa*, 126 em *Arabidopsis thaliana* e 152 em *Zea mays* e em *Glycine max* (LE *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2009; SHIRIGA *et al.*, 2014), os fatores de transcrição da família NAC têm sido relacionados a eventos de desenvolvimento e a respostas a estresses bióticos e abióticos (GAHLAUT *et al.*, 2016; OLSEN *et al.*, 2005). Vários membros funcionalmente estudados da família NAC apresentam papéis essenciais no desenvolvimento floral e morfogênese (SABLOWSKI e MEYEROWITZ, 1998) formação e manutenção do meristema apical (AIDA *et al.*, 1997; SOUER *et al.*, 1996), sinalização hormonal (XIE *et al.*, 2000), regulação da síntese da parede celular secundária (NEGI *et al.*, 2017), regulação de senescência (PIMENTA *et al.*, 2016), controle do ciclo celular (KIM *et al.*, 2006), desenvolvimento de raízes laterais (HAO *et al.*, 2011), resposta a infecção por patógenos (COLLINGE e BOLLER, 2001; SELTH *et al.*, 2005) e resposta a diferentes estresses abióticos (CHUNG *et al.*, 2018; FANG *et al.*, 2008; TRAN *et al.*, 2004).

O primeiro fator de transcrição do tipo NAC a ser identificado e caracterizado foi o gene NAM (*no apical meristem*), de petúnias, o qual também fornece a primeira letra para o acrônimo NAC. A maioria das petúnias mutantes *nam* não possuem o meristema apical e morrem ainda muito jovens, apresentando como característica marcante a fusão de cotilédones; e os brotos, que conseguem ocasionalmente se desenvolverem, apresentam um desenvolvimento floral aberrante (SOUER *et al.*, 1996). De forma similar, notou-se que mutações simultâneas nos genes CUC1 e CUC2 (*cup-shaped cotyledon*) de *Arabidopsis* causam defeitos semelhantes aos do fenótipo *nam* (AIDA *et al.*, 1997). Foi observado ainda que as proteínas NAM, CUC1 e CUC2 possuíam em comum o domínio conservado NAC, daí as proteínas CUC terem fornecido a terceira letra para o acrônimo NAC.

Em *Arabidopsis* três genes NACs da subfamília SNAC-A (ATAF), *ANAC019*, *ANAC055* e *ANAC072* são induzidos por seca, ABA (ácido abscísico) estresse salino e/ou baixa temperatura. Além disso, linhagens transgênicas superexpressando esses genes apresentaram um aumento da tolerância à seca e da expressão de vários genes induzidos por estresse (TRAN *et al.*, 2004). Também da subfamília SNAC-A (ATAF), tem sido mostrado que o gene *ATAF1* tem sua expressão fortemente induzida pela seca e por tratamento com ácido abscísico (ABA) e é inibido por alagamento. Além disso, como um regulador transcricional, a proteína ATAF1 está relacionada à regulação negativa da expressão de genes responsivos ao déficit hídrico e da biossíntese de ABA em

Arabidopsis, evidências que mostram um papel desse fator de transcrição na resposta ao déficit hídrico (LU *et al.*, 2007; JENSEN *et al.*, 2013).

Existem ainda inúmeros exemplos de TFs NACs atuando nos mais diversos processos celulares e em redes de sinalização em resposta aos mais diversos tipos de estímulos. Entretanto, apesar de os fatores de transcrição NACs estarem sendo progressivamente caracterizados estrutural e fisiologicamente, as funções da maioria dos membros dessa família ainda permanecem desconhecidas (FANG *et al.*, 2008). Em algumas espécies, como a soja, excetuando-se por alguns casos, como GmNAC30 (MENDES ET AL., 2013), GmNAC81 (FARIA ET AL., 2011), a caracterização funcional e biológica de TFs NACs e sua participação em vias de sinalização têm se baseado primariamente na homologia de genes NACs com genes da mesma família em organismos modelo (DONG *et al.*, 2013a; HAO *et al.*, 2011; MITSUDA *et al.*, 2005; MITSUDA *et al.*, 2007).

2.2. UPR e via de morte celular mediada por proteínas NRP/DCDs

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela altamente dinâmica que está envolvida em diversas funções celulares importantes, como síntese de proteínas, dobramento, processamento e controle de qualidade de proteínas secretoras recentemente sintetizadas, além da manutenção da homeostase de Ca^{2+} (SILVA *et al.*, 2015). Diante do importante papel dessa organela, a célula dedica esforços para uma manutenção rigorosa da homeostase do RE, o qual se destaca como uma organela de sinalização chave, envolvida na percepção e ativação de respostas ao estresse em células eucariotas (LIU, HOWELL, 2010; REIS *et al.*, 2016).

Em condições normais, a taxa de síntese de proteínas e a capacidade de processamento do RE estão em equilíbrio. Entretanto, condições ambientais estressantes ou situações que exigem intensa secreção de proteínas podem prejudicar esse equilíbrio, gerando um desbalanço que culminará com o acúmulo de proteínas mal dobradas na organela, condição responsável por gerar o chamado estresse no RE (HOWELL, 2013; WAN, JIANG, 2016). O estresse no RE pode ter consequências deletérias para a célula e, portanto, na tentativa de lidar com essa condição e reestabelecer a homeostase do RE, as células eucarióticas desenvolveram uma via de sinalização citoprotetora conhecida como via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR) (GARDNER *et al.*, 2013).

A ativação da via UPR culmina com a superexpressão coordenada de chaperonas moleculares residentes do retículo e de componentes da via de degradação de proteínas associada ao RE (ERAD), além de promover uma degradação seletiva de mRNAs e repressão traducional. Este cenário resulta em três estratégias principais para a restauração das condições de equilíbrio: (1) aumento da capacidade de dobramento de proteínas pelo RE; (2) aceleração da degradação de proteínas mal dobradas; e (3) alívio da carga de proteínas direcionadas para o RE (GARDNER et al., 2013; WAN, JIANG, 2016). No entanto, sob condições de estresse severas e prolongadas, a via UPR por si só pode não ser capaz de restaurar o funcionamento do retículo e o crescimento celular, o que culminará com a ativação de um sinal de morte celular (RUBERTI & BRANDIZZI, 2014).

Tem sido demonstrado que o estresse prolongado no RE desencadeia tanto vias de sinalização de morte celular programada (PCD – programmed cell death) específicas do RE quanto vias de PCD compartilhadas, ou seja, provocadas também por outros estímulos de morte (REIS et al., 2016). Uma via de sinalização de PCD específica de plantas, conhecida como via de morte celular mediada por proteínas NRP/DCDs, foi descrita em soja como uma via integrativa de sinais de estresse no RE e osmótico e tem sido caracterizada como uma relevante resposta adaptativa de plantas a estresses e a eventos de desenvolvimento, como senescência natural de folhas (REIS & FONTES, 2012; PIMENTA et al., 2016).

Essa via foi inicialmente identificada por meio de um perfil de expressão global em folhas de soja tratadas com polietilenoglicol (indutor de estresse osmótico) ou tunicamicina/AZC (indutores de estresse no RE) que mostrou a existência de genes co-regulados que foram sinergicamente induzidos por ambos os estresses (IRSIGLER et al., 2007; REIS & FONTES, 2012). Entre eles, destaca-se a proteína NRP, que contém um domínio de desenvolvimento e morte celular específico de plantas (DCD – development and cell death). A proteína NRP/DCD corresponde, portanto, ao primeiro componente dessa via de sinalização, que integra os sinais de estresses do ER e osmótico em uma resposta de morte celular, a ser descrito; daí se deu o nome à via de sinalização.

A via de PCD mediada por NRP/DCDs se inicia com a indução do fator de transcrição GmERD15 (*Glycine max Early Responsive to Dehydration 15*) por estresses osmótico e no RE (Figura 2). Este, por sua vez, se liga ao promotor de genes de proteínas NRP/DCDs, e assim ativa a expressão das proteínas NRP-A e NRP-B (ALVES et al., 2011). A expressão das proteínas NRPs levam à ativação do promotor dos genes

GmNAC081 e *GmNAC030*, induzindo à expressão destes (FARIA et al., 2011; MENDES et al., 2013; REIS & FONTES, 2012). O fator de transcrição *GmNAC081* age em conjunto com *GmNAC030* para ativar a expressão da enzima de processamento vacuolar (VPE), a qual exibe atividade de caspase-1, atuando como a executora do processo de PCD por meio do colapso do vacúolo (MENDES et al., 2013; HATSUGAI et al., 2015).

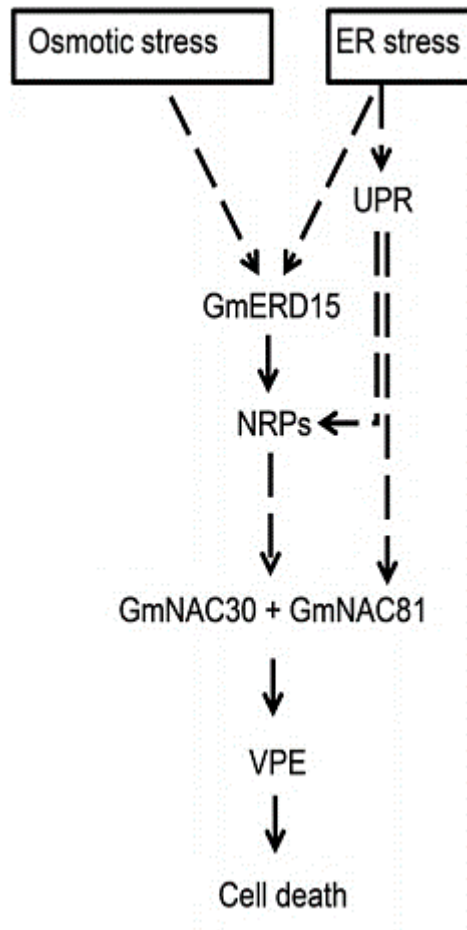


Figura 2. Via de sinalização de morte celular mediada por NRP/DCDs em resposta aos estresses osmótico e do retículo endoplasmático. O esquema ilustra a propagação de um sinal de morte celular, derivado da exposição da planta a estresses osmótico e do retículo endoplasmático por um período prolongado, através da ativação da via de sinalização de PCD mediada por NRP/DCDs. Setas tracejadas indicam um efeito na expressão do gene, enquanto setas cheias indicam que o gene é um alvo imediato a jusante. UPR, unfolded protein response (MENDES et al., 2013).

Como um ramo da resposta ao estresse no retículo que se conecta com respostas a outros estímulos ambientais, essa via se apresenta como uma importante resposta adaptativa a múltiplos estresses e assim como um potencial alvo para a engenharia genética. No entanto, a inexistência de ferramentas moleculares adequadas para o estudo

da via em soja dificulta o avanço da caracterização aprofundada dos mecanismos de ação desta resposta de morte celular. Sendo assim, tornou-se necessário avaliar a conservação funcional da via de morte mediada por proteínas NRPs em outras espécies, em especial em organismos modelo, o que permitiria uma melhor caracterização da mesma. Dentro dessa premissa, os estudos desenvolvidos por Silva *et al.* 2015 e Reis *et al.* 2016 apresentaram as primeiras evidências da conservação da via mediada por proteínas NRPs em outras espécies de plantas.

Em *Arabidopsis*, as proteínas AtNRP1, AtNRP2, ANAC36 e VPE γ foram descritas como ortólogos, respectivamente, das proteínas NRPs, NAC081 e VPE da via de sinalização de morte celular descrita em soja. Todas elas foram induzidas por estresse osmótico e no retículo endoplasmático e a expressão transiente dessas proteínas em folhas de *Nicotiana benthamiana* foi capaz de induzir morte celular. Além disso, mutantes para essas proteínas em *Arabidopsis* se mostraram mais tolerantes à morte celular induzida por estresse no RE (REIS *et al.*, 2016). Análises *in silico* indicaram também que várias outras espécies possuem em seus genomas sequências conservadas de componentes da via, as quais compartilham analogia funcional a seus correspondentes em soja.

De modo complementar, em estudo realizado por Silva *et al.* (2015), o gene *ANAC002/ATAF1* foi identificado como o possível ortólogo de *GmNAC30* em *Arabidopsis*; entretanto, a conservação de função entre essas duas proteínas ainda não foi comprovada experimentalmente. ATAF1 tem sido descrito como um importante regulador transcricional, desempenhando papéis relevantes no desenvolvimento de plantas e sua adaptação a diferentes estresses (LU *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2009; JENSEN *et al.*, 2013; GARAPATI *et al.*, 2015). Dessa forma, comprovar a participação dessa proteína na via de PCD mediada por NRPs além de caracterizar um importante componente da via em *Arabidopsis*, levantaria a possibilidade da conexão dessa via com a resposta adaptativa a diversos outros processos celulares e condições adversas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, o qual se localiza no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e está associado ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) em Interações Planta-Praga.

3.1. Análises bioinformática

3.1.1. Análises filogenéticas

O gene de soja *GmNAC30* previamente caracterizado como componente da via de morte celular mediada por proteínas NRP/DCDs foi utilizado como protótipo para a busca no Blast por ortólogos nos genomas de, *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris*, *Vitis vinífera*, *Gossypium raimondii*, *Eucalyptus grandis*, *Sorghum bicolor*, *Nicotiana benthamiana* e *Glycine max*. Foram selecionadas as 10 sequências mais relacionadas de cada espécie para a construção da árvore filogenética usando inferência Bayesiana. A sequência de aminoácidos dos genes ortólogos foram obtidas nos bancos de dados TAIR (<http://arabidopsis.org/>) e Phytozome v12.1.

Para as análises filogenéticas, as sequências de aminoácidos foram alinhadas utilizando o programa MUSCLE (EDGAR, 2004). A árvore filogenética foi construída utilizando inferência Bayesiana realizada com MrBayes v3.2.2 (RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P, 2003) com o modelo de substituição de aminoácidos mistos (Jones). As análises foram realizadas com 10.000.000 gerações e excluindo as primeiras 2.500.000 gerações como burn-in. As árvores foram visualizadas com o software Figtree v 1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

3.1.2. Matriz de identidade de sequência

As sequências de aminoácidos de homólogos de *GmNAC30* foram alinhadas com todos os possíveis pares de sequências usando o algoritmo Muscle. Em seguida, os escores de identidade foram calculados como $1 - (M/N)$, onde M é o número de nucleotídeos incompatíveis e N é o número total de posições ao longo do alinhamento. Baseando-se na matriz de identidade de sequência, uma árvore filogenética enraizada foi

obtida utilizando o método *neighbour joining* para agrupar sequências com base em escores de similaridade (MUHIRE *et al.*, 2014). O plot da matriz de identidade foi obtido utilizando pacote *ggplot* (WICKHAM *et al.*, 2008) do software R (<https://cran.r-project.org/>).

3.2. Material Vegetal

3.2.1. *Arabidopsis thaliana*

Foi utilizado o mutante nocaute do gene *ATAF1* por inserção de T-DNA, SALK_057618, obtido do Salk Institute for Biological Studies. SALK_057618 contém uma inserção de T-DNA no terceiro exon do gene *ATAF1* e será aqui designado como *ataf1-2*, conforme previamente reportado (LU *et al.*, 2007; JENSEN *et al.*, 2007; WANG *et al.* 2009). A confirmação do mutante foi feita por PCR, utilizando-se os três primers ANAC002LP, ANAC002RP e LBB1.3 (Tabela 1). Plantas homozigotas para a mutação em *ATAF1* foram utilizadas para análises posteriores.

3.2.2. Soja

Sementes de soja (WT) (*Glycine max* cv. BR16) foram germinadas em uma mistura de solo, substrato e areia (3:1:1) e crescidas em casa de vegetação sob condições naturais de luz, umidade relativa (65-85%) e temperatura (15-35°C). Ao atingirem o estágio de desenvolvimento entre V3 e V4 (FEHR; CAVINESS, 1977), estas foram submetidas aos tratamentos de estresse descritos no item 3.8.

3.3. Clonagem dos genes *AtATAF1* e *AtATAF2*

Os genes *AtATAF1* (At1g01720) e *AtATAF2* (At5g08790), foram amplificados a partir de cDNA de *Arabidopsis* utilizando os oligonucleotídeos AtATAF1-Fwd/AtATAF1-NS-Rvs e AtATAF2Gw-Fwd/AtATAF2GW-NS-Rvs, respectivamente, adaptados ao sistema *Gateway*® *cloning technology* (Invitrogen) (Tabela 1).

Procederam-se a duas reações sequenciais de PCR (30 ciclos - volume final de 25µL e 50µL, respectivamente) contendo 1µL de cDNA (~200 ng), 1 µL de oligonucleotídeos fwd (10 µM), 1 µL de oligonucleotídeos rvs (10 µM), 4 µL de dNTPs (2,5 mM), 5 µL de tampão da enzima 10X, 4 µL de MgSO₄ (50 mM) e 0,2 µL de enzima *Platinum Taq High Fidelity polymerase* (Invitrogen) (2 U). As reações consistiram na

amplificação da ORF utilizando oligonucleotídeos específicos na primeira etapa e inserção das regiões de recombinação sítio dirigida attB1 e attB2 na segunda etapa. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação de cada ORF encontram-se descritos na Tabela 1.

Depois de amplificados, os insertos foram purificados diretamente do gel de agarose utilizando o kit *QIAquick Gel extraction Kit* (QIAGEN) e inseridos em vetores de entrada pDONR 201[®]/pDONR 221[®] e pDONR 207[®] (Invitrogen) por meio de recombinação sítio dirigida utilizando a enzima BP Clonase (Invitrogen). Os produtos da reação de recombinação foram transformados em células de *E. coli* linhagem DH5 α eletrocompetentes e os transformantes selecionados em meio LB-ágar suplementado com canamicina (para o vetor pDONR201) ou gentamicina (para o vetor pDONR207), nas concentrações de 100 μ M e 20 μ M, respectivamente. Os DNAs plasmidiais das colônias positivas foram extraídos utilizando o kit *QIAprep Spin Miniprep kit* (QIAGEN) e enviados para sequenciamento automatizado de Sanger para a confirmação da identidade dos clones. Os clones resultantes foram pUFV3076 (pDONR201ns-ATAF1), pUFV3093 (pDONR207ns-ATAF1), pUFV3148 (pDONR221ns-ATAF2) e pUFV3147 (pDONR207ns-ATAF2) (Tabela 2).

Em sequência, por meio da reação de recombinação catalisada pela enzima LR Clonase (Invitrogen), os insertos foram transferidos para os vetores de expressão em leveduras pDEST22 e pDEST32 (Two Hybrid Yeast System - Invitrogen). Os clones resultantes foram pUFV3115 (pAD-AtATAF1), pUFV3095 (pBD-AtATAF1), que expressam os domínios de ativação da transcrição (AD) ou o domínio de ligação (BD) ao DNA do fator GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae*, fusionados aos respectivos insertos (NAC). Simultaneamente, os insertos foram transferidos também para os vetores binários de transformação em plantas pEarleyGate103, pK7FWG2, que permitem a expressão do gene de interesse fusionado a GFP e sob o controle do promotor 35S, sendo gerados os clones pUF3131 (35S::AtATAF1-GFP) e pUFV3151 (35S::AtATAF2-GFP). Todos clones gerados encontram-se descritos na Tabela 2.

3.4. Ensaio de transativação em leveduras

O ensaio de transativação utilizando o sistema de duplo híbrido em leveduras foi realizado com os clones pUFV3095 ou pUFV3096, contendo o gene *ATAF1* e *ANAC036*, respectivamente, clonados em pDEST32 (Tabela 2). Para fins comparativos, o mesmo foi

feito com os clones pUFV1417 e pUFV871, contendo respectivamente os genes GmNAC30 e GmNAC081 clonados em pDEST32 (PINHEIRO *et al.*, 2009; MENDES *et al.*, 2013). Em leveduras com o gene HIS3 sob o controle de um promotor contendo o sítio de ligação de GAL4, a capacidade de transativação da proteína analisada é monitorada pela auxotrofia em histidina.

A levedura *S. cerevisiae* estirpe AH109 (MATa, Trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, LYS2::GAL1UAS-GAL1TATAHIS3, MEL1GAL2UAS-GALTATA::MELUAS-MEL1TATA-lacZ) foi transformada com os clones pUFV3115, pUFV3095, pUFV3119, pUFV3120, pUFV1417, pUFV1449 ou pUFV871, juntamente com 2 mg de DNA carreador de espermatozoides de salmão (ssDNA) utilizando-se o método PEG-acetato de lítio. Os transformantes positivos foram selecionados em meio sólido SD deficiente em leucina (SD/-leu/), já que o vetor possui marca auxotrófica para esse aminoácido. Para verificar a capacidade de transativação, as colônias positivas foram crescidas por 16 horas em meio líquido SD/-leu/ até atingirem a densidade ótica (D.O.) superior a 1,0 e a cultura foi diluída em meio SD/-leu/ até D.O. igual a 1,0, 0,1 e 0,01. Todas as diluições foram plaqueadas em gotas de 10 µL em meio sólido SD deficiente em leucina e histidina, acrescidas de 3-aminotriazol nas concentrações de 0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM e 10 mM e incubadas por 4 dias a 28°C para verificação do potencial de transativação.

3.5. Ensaio de interação proteína-proteína pelo sistema de duplo-híbrido de leveduras

Para testar a interação entre ATAF1 e ANAC36, a construção pUFV3115, contendo ATAF1 fusionado ao domínio de ativação (AD) de Gal-4 (Tabela 2), foi transformada em leveduras AH109 e os transformantes positivos foram, subsequentemente, co-transformados com a construção pUFV3096 contendo a proteína ANAC36 fusionada ao domínio BD de GAL4 (Tabela 2). O procedimento de transformação foi realizado conforme descrito no tópico 3.4. As leveduras transformadas foram plaqueadas pelo método de gotas em meio seletivo com deficiência em leucina, triptofano e histidina, e suplementado com concentrações variando de 0 - 10 mM de 3-aminotriazol. As placas foram incubadas por três dias a 28°C. Foram testadas também as interações ATAF1-GmNAC081 e ANAC036-GmNAC030.

3.6. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

Aproximadamente 50 ng de DNA plasmídial e 50 µL de células competentes foram eletroporadas a 2500 V durante 4 a 5 milissegundos. Em seguida, 800 µL de meio LB foi adicionado e prosseguiu-se à incubação durante 2 horas a 28°C. Após o período de incubação, as células recuperadas foram centrifugadas durante 3 min. a 4000xg e concentradas para 100 µL. A solução foi plaqueada em meio LB sólido contendo 40 mg.L⁻¹ de gentamicina e 100 mg.L⁻¹ de espectinomicina ou canamicina, dependendo da resistência característica do vetor. As placas foram incubadas durante dois dias ininterruptos a 28°C e as colônias positivas foram diagnosticadas no final dessa etapa, por meio de PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos para os genes de interesse. Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose 1% (p/v) corado com brometo de etídeo 0,1 µg/mL.

3.7. Verificação de localização subcelular de AtATAF1 e AtATAF2

As construções de DNA pUFV3131 ou pUFV3151, contendo a respectivamente a ORF clonada do gene *ATAF1* ou *ATAF2* no vetor binário de expressão pk7FWG2/pEarleygate103 (Tabela 2), foram utilizadas para a transformação de células de *Agrobacterium tumefaciens* linhagem GV3101 eletrocompetentes, conforme descrito no item 3.6.

Em seguida, folhas de *Nicotiana benthamiana* com 3 a 4 semanas foram co-infiltradas com GV3101 transformada com pGFP-AtATAF1 ou pGFP-AtATAF2 juntamente com GV3101 transformada com 2x35S::WWP1-mCherry (pUFV2179 – CALIL, 2017), um marcador de núcleo (Tabela 2). O procedimento de infiltração foi realizado conforme descrito por Carvalho *et al.* 2008. Após 3 dias da inoculação, segmentos foliares de aproximadamente 0,5 cm² foram excisados das folhas infiltradas, depositados em lâminas de vidro para microscopia, cobertos com água deionizada e observados ao microscópio confocal de varredura laser Zeiss LSM510 META. A excitação do GFP foi a 488 nm e a emissão foi detectada usando um filtro de 500-530 nm. Para o mCherry a excitação foi em 540 nm e a emissão de 608-680nm.

3.8. Estresse em soja

Plantas de soja, crescidas nas condições descritas no item 3.2, foram submetidas a estresse osmótico, do retículo endoplasmático e estresse biótico por meio do tratamento

com PEG (PM 8000 - 0,5% v/v), tunicamicina (5 µg/mL) e ácido salicílico (5mM), respectivamente.

As soluções para o ensaio foram preparadas utilizando a solução nutritiva de Hoagland como solvente para minimizar as respostas de estresse induzidas pela retirada da planta do solo. A solução de tunicamicina foi preparada utilizando uma solução estoque do composto diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) na concentração de 50 µg/mL e a solução de ácido salicílico foi preparada dissolvendo-se 0,497g do composto em um volume de 720 mL de solução de Hoagland. No caso da solução de PEG, utilizou-se uma solução estoque de 10% (p/v) do composto diluído em água. Para os controles (tempo de 0 h), utilizou-se apenas solução nutritiva de Hoagland acrescida de DMSO (para os tratamentos com tunicamicina) ou a solução nutritiva pura (para o tratamento com PEG e ácido salicílico).

Em cada ensaio, foram utilizadas 12 plantas no mesmo estágio de desenvolvimento e com as mesmas características (tamanho do caule, tamanho das folhas e tamanho da raiz), aclimatadas por 24 horas em frascos individuais com 15 mL de solução nutritiva de Hoagland. Após o tempo de tratamento, as plantas foram retiradas da solução e discos foliares com diâmetro de 1 cm foram coletados, armazenados em tubos eppendorf e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. O restante da parte aérea da planta também foi coletado e congelado. Todo o material biológico foi armazenado a -80 °C em ultrafreezer após o ensaio.

3.9. Estresse em plântulas de Arabidopsis

Para os ensaios de indução de estresse osmótico e no retículo endoplasmático, inicialmente plântulas de Arabidopsis foram germinadas em meio MS (½ força) (MURASHIGE & SKOOG, 1962). Transcorridos 15 dias, essas foram transferidas para placas de 12 poços contendo meio MS (¼ força) líquido, e deixadas aclimatando por 24 h. Os tratamentos foram iniciados pela substituição do meio por uma solução de polietilenoglicol 10% (p/v) (PEG: MW 8000) em meio MS (¼ força) líquido, para indução de estresse osmótico, e pela adição de uma solução de Tunicamicina (TUN) 2,5 µg/mL em meio MS (¼ força) líquido. Para cada tratamento foram utilizadas 4 repetições, sendo cada uma composta por 13 plântulas. Para os controles (tempo de 0 h), utilizou-se apenas meio MS (¼ força) líquido acrescido de DMSO (para o tratamento com tunicamicina) ou meio MS (¼ força) líquido puro (para o tratamento com PEG).

Os tempos de tratamento foram de 0 h e 8 h para tunicamicina e de 0 h, 8 h e 24h para PEG. Após os tempos de tratamento as plântulas foram retiradas da solução, o excesso de meio foi removido com papel e elas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. Todo o material biológico foi armazenado a -80 °C após o ensaio.

3.10. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído de plântulas de *Arabidopsis* ou folhas de soja utilizando o reagente Trizol[®] (Life Technologies), segundo recomendações do fabricante. Para a eliminação de DNA, o RNA total foi tratado com 2U de DNase livre de RNase (Life Technologies). O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific) na razão 260 nm/280 nm e examinado por eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,5% (p/v), corado com brometo de etídio 0,1 µg/mL. O cDNA foi sintetizado utilizando 4 µg de RNA total, oligo-dT (18) a 5 µM, dNTP 0,5 mM e 1U da enzima Transcriptase Reversa M-MLV (Invitrogen), segundo as recomendações do fabricante.

3.11. Ensaio de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Todos os procedimentos de PCR em tempo real, incluindo testes de eficiência, validações, e experimentos, foram conduzidos de acordo com as recomendações contidas nos manuais fornecidos pela empresa ThermoFisher. As reações foram conduzidas no equipamento ABI7500 *Real Time PCR Systems* (ThermoFisher), utilizando SYBR[®] *Green PCR Master Mix* (Life Technologies).

As reações de amplificação foram realizadas utilizando-se 20 ng de cDNA, primers a 0,6µM e o protocolo descrito a seguir: 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos a 94°C por 15 s e 60°C por 1 min, seguido da etapa de dissociação. A expressão de genes foi avaliada utilizando o método comparativo de Ct: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e $2^{-\Delta Ct}$.

Como gene normalizador para experimentos realizados utilizando cDNA de soja, foi escolhido o gene *UKN-2* (MA *et al.*, 2013). Para confirmar o estado de estresse induzido por PEG, tunicamicina e ácido salicílico, utilizaram-se os genes marcadores *SMP* (*seed maturation protein*), *CNX* (calnexina), *PDI* (*protein disulfide isomerase*) e *PR-4* (NPR4).

Para experimentos com cDNA de *arabidopsis* foi utilizado o gene da actina como controle endógeno para a normalização dos dados, enquanto que os genes *CNX* e *RAB18*

foram utilizados como marcadores de estresse no RE e de estresse osmótico respectivamente (REIS et al., 2016). A sequência de todos os oligonucleotídeos utilizados para as reações de qRT-PCR encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para clonagens, diagnósticos e qPCR

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Gene/sequência em que se anela	Locus
ANAC002LP	TCCCAGGGACAGAAAATATCC	Confirmação de knockout	-
ANAC002RP	AAATATTAATTGATTGCGGCAC		
LBB1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC		
35AMVF	CCACTATCCTTCGCAAGAC	NAC081 transgene	-
NAC6R	TCTCTCTTCTCTAGTGCTCG		
AtATAF1 Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGTCAGAA	ATAF1	At1g01720
AtATAF1NS Rvs	AGAAAGCTGGGTCGTAAGGCTTCTGC		
AtATAF2GW Fwd	AAAAAGCAGGCTTCACAATGAAGTCGGAGCT AAATTTAC	ATAF2	At5g08790
AtATAF2GWNS Rvs	AGAAAGCTGGGTCCCCCTGTGGAGCAAAACTC		
AttB1_2942	GGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT	Sequência sítio gateway AttB1	-
AttB2_2943	GGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	Sequência sítio gateway AttB2	-
GFP_4799 Rvs	CGCCCTCGCCCTCGCCGGACAC	Green Fluorescent Protein (GFP)	-
3397 (Fwd)	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATC	pDONR201/207	-
3398 (Rvs)	TGTAACATCAGAGATTTTGAGACAC		
MC36 (Fwd)	TCCTTCGCAAGACCCTTCTC	Promotor 35S	-
DEST32-Fwd	AACCGAAGTGCCCAAGTGTCTG	Vetor pDEST32	-
DEST22-Fwd	TATAACGCGTTTGAATCACT	Vetor pDEST22	-
DEST22-Rvs	AGCCGACAACCTTGATTGGAGAC	Vetores pDEST32 / pDEST22	-
qRTACTINA Fwd	ATGTCGTGAGCCATCCTGTC	Actina 3	At1g13180
qRTACTINA Rvs	ACACCGGATTCGTGCGGCAT		
qRT-CNX1 Fwd	ATGAGACAACGGCAACTATTTTCC	Calnexina 1	At5g61790
qRT-CNX1 Rvs	CCATAATCCTCATGTCCTTCACT		
qRT-RAB18 Fwd	CGATCCAGCAGCAGTATGAC	RAB18	AT1G43890
qRT-RAB18 Rvs	TTCGAAGCTTAACGGCCACC		
qAtNRP1 Fwd	TTCGACAACATCAATTCCA	NRP1	At5g42050
qAtNRP1 Rvs	CCACAGGTCCGAATCCTAAA		
qRT-ANAC036 Fwd	TCCTCTTTCGTCTTCCGAGA	ANAC036	At2g17040
qRT-ANAC036 Rvs	TGCATTTGGATCTTGTTTGC		
qRT-VPEg Fwd	GAAGCGTCTGATGATGTT	VPEg	At4g32940
qRT- VPEg Rvs	AGCCACCTAGTACCGGAGT		

qRTAtATAF1 Fwd	AGTTCACGAGCGAGGTTTCAG	ATAF1	At1g01720
qRTAtATAF1 Rvs	ATCCACGGTGGCATCAATGT		
qRTGm04G249000.1-Fwd	ACACGGACTCGAGCTGTTC	GmNAC022	Glyma.04G249000.1
qRTGm04G249000.1-Rvs	TCTCCCACTCCTTCCACTTT		
qRTGm13G030900.1-Fwd	CAGGGCAACAGCGAGTTTT	GmNAC011	Glyma.13G030900.1
qRTGm13G030900.1-Rvs	GCCTGGAGAGGTACATGAAG		
qRTGm04G208300.1-Fwd	AGTGGAAACGATGATCTGGAC	GmNAC018	Glyma.04G208300.1
qRTGm04G208300.1-Rvs	AGTGCCAAAAAGGTAATCATCC		
qRTGm06G114000.1-Fwd	ACGGCGAAGACGGATTACATG	GmNAC035	Glyma.06G114000.1
qRTGm06G114000.1-Rvs	GTTCCACTTGGGCTCGCTT		
qRTGm06G157400.1-Fwd	ATTGTTGTACACGGAGACTTCA	GmNAC039	Glyma.06G157400.1
qRTGm06G157400.1-Rvs	TTCCCTCTCGCACCTCACAT		
NAC030 Fwd	TGCCGGAAGCGGGTACT	GmNAC30	Glyma.05G195000
NAC030 Rvs	CGGATTTCCGATCGGTTTG		
SMP Fwd	GCCGAACGAGGAAAAGACGAACC	SMP	-
SMP Rvs	CTTGGGCTGTTTGTGGGTGTTT		
CALN Fwd	TGATGGGGAGGAGAAGAAAAAGGC	CNX	-
CALN Rvs	CACTTGGGTTTGGGATCTTGGCTC		
PDI Fwd	TTGGTTGAAGGCGTACAAGGATGG	PDI	-
PDI Rvs	ACTCCAGCAGAACTATCTTCCAG		
PR-4 Fwd	TGCGGGTGACAAATACAGGA	PR-4	-
PR-4 Rvs	TGCTGCACTGATCTACGATTCTC		
UNK-2 Fwd	GCCTCTGGATACCTGCTCAAG	UNK-2	-
UNK-2 Rvs	ACCTCCTCCTCAAACCTCCTCTG		
ATAF2ARAB-FW-RT	ACCACGACAATGGCTGAACAGT	ATAF2	At5g08790
ATAF2ARAB-RV-RT	CCATTTAGGCTCGCTCTGAACCT		

Tabela 2. Listagem de clones em *Escherichia coli* utilizados no desenvolvimento do trabalho

Identificação do clone	Descrição	Vetor
pUFV3093	pDONR207ns-AtATAF1	pDONR207
pUFV3076	pDONR201ns-AtATAF1	pDONR201
pUFV3131	35S::AtATAF1-GFP	pK7FWG2
pUFV3115	pAD-AtATAF1	pDEST22
pUFV3095	pBD-AtATAF1	pDEST32
pUFV3147	pDONR207ns-AtATAF2	pDONR207
pUFV3148	pDONR221ns-AtATAF2	pDONR221
pUFV3151	35S::AtATAF2-GFP	pEarleyGate103
pUFV3078	ANAC036 ⁷⁹⁻⁸²⁸ ns-pDONR207	pDONR207
pUFV3116	pAD-ANAC036 ⁷⁹⁻⁸²⁸	pDEST22
pUFV3096	pBD-ANAC036 ⁷⁹⁻⁸²⁸	pDEST32
pUFV3119	ANAC036 ⁷⁹⁻⁸²⁸ -cYFP	pSPYCE

pUFV3120	ANAC036 ⁷⁹⁻⁸²⁸ -nYFP	pSPYNE
pUFV1417	pBD-GmNAC30 (Mendes <i>et al.</i> , 2013)	pDEST32
pUFV1449	pAD-GmNAC30 (Mendes <i>et al.</i> , 2013)	pDEST22
pUFV871	pBD-GmNAC081 (Pinheiro <i>et al.</i> , 2009)	pDEST32
pUFV2179	2x35S::WWP1-mCherry (Calil, 2017)	

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise *in silico* da subfamília SNAC-A (ATAF) pertencente a superfamília de NACs

O gene de soja *GmNAC30*, previamente caracterizado como um componente da via de morte celular mediada por proteínas NRP/DCDs, foi utilizado como base para a identificação de homólogos em genomas de *Arabidopsis thaliana*, *Solanum lycopersicum*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris*, *Vitis vinífera*, *Gossypium raimondii*, *Eucalyptus grandis*, *Sorghum bicolor*, *Nicotiana benthamiana* e *Glycine max*. Os 10 componentes mais relacionados de cada espécie vegetal foram utilizados para a construção de uma árvore filogenética usando uma inferência Bayesiana (Figura 3). Esta estratégia recuperou a maioria de genes da subfamília SNAC-A (ATAF) (agrupamentos delimitados pela linha vermelha), além de alguns membros da subfamília SNAC-B (NAP), compreendendo os agrupamentos delimitados pela linha azul (Figura 3).

Uma característica que se destaca no genoma de soja é a retenção de blocos de genes duplicados, sendo que dos 46.430 genes codificantes de alta confiança do genoma de soja, 31.264 existem como parálogos e o restante como genes isolados (SCHMUTZ *et al.*, 2010). Consistente com os eventos de duplicação, os seis parálogos já conhecidos de *GmNAC30* (distribuídos entre os grupos em laranja e verde – Fig. 3; SILVA *et al.*, 2015) se agruparam aos pares, sendo os genes *GmNAC18* e *GmNAC39* provavelmente os mais relacionados a *GmNAC30*, visto que se agruparam mais próximos.

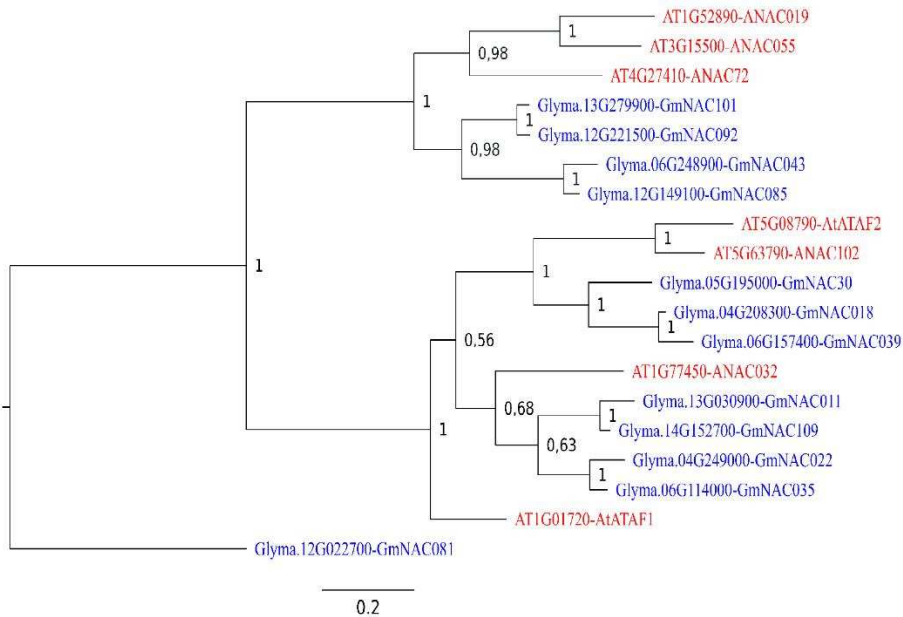
GmNAC30 é um dos componentes a jusante na via de morte celular mediada por NRP/DCDs, atuando em conjunto com o TF *GmNAC081* na ativação da expressão da enzima VPE, uma caspase-1-like que intermedia o processo de morte celular pelo colapso do vacúolo (MENDES *et al.*, 2013). Além disso, tem sido demonstrado que *GmNAC30* é induzido por estresse salino, seca, desidratação, frio, ácido salicílico, metil-jasmonato e por ABA (este último principalmente em raízes) (CHAI *et al.*, 2015; PIMENTA *et al.*, 2016). Consistente com a proposta da conservação da via de PCD mediada por NRPs no reino vegetal (REIS *et al.*, 2016), foi observado a presença de homólogos de *GmNAC30* em todas as espécies de plantas analisadas (Figura 3).

A subfamília SNAC-A (ATAF) é mais bem caracterizada em *Arabidopsis*, sendo composta por sete membros altamente conservados (NAKASHIMA *et al.*, 2012; TAKASAKI *et al.*, 2015). A fim de delimitar a subfamília SNAC-A (ATAF) em soja, os genes NAC de soja foram comparados com os genes SNAC-A de *Arabidopsis*, resultando em um agrupamento com estabilidade interna alta (bootstrap > 50%; Figura 4A). Observa-se que a subfamília SNAC-A de soja sofreu expansão durante especiação aumentando o número de membros de sete em *Arabidopsis* para 11 em soja. GmNAC030 foi utilizado como protótipo em múltiplo alinhamento de sequências, o que demonstrou que todos os 11 membros da subfamília SNAC-A de soja possuem o domínio NAC completo com os subdomínios A-E altamente conservados (Figura 5).

Na figura 5, um possível sinal de localização nuclear é sublinhado em GmNAC030, cuja única divergência de sequência entre os membros da subfamília é representada por um aminoácido destacado em preto. Exceto para os genes duplicados GmNAC011 e GmNAC109, os demais genes duplicados possuem o sinal de localização nuclear praticamente idênticos. O motivo conservado de ativação de transcrição, descritos em membros do grupo ATAF, está presente em todos os 7 GmNACs que agrupam com ATAF1 e ATAF2, incluindo GmNAC030. Os 4 GmNACs remanescentes formam um subclado separado de ATAF1 e ATAF2, sendo, portanto, mais divergentes em sequência e provavelmente em função.

Em *Arabidopsis*, foram observados 4 membros que se alinharam próximos a GmNAC30, incluindo ATAF1 (ANAC002/AT1G01720), ANAC032 (AT1G77450), ATAF2 (ANAC081/AT5G08790) e ANAC102 (AT5G63790), sendo que esses dois últimos se agruparam em par, apresentando cerca de 87% de identidade de sequência entre si, um forte indício de serem parálogos (Figura 4B). Análises *in silico* de comparação das sequências dessas quatro proteínas com a sequência de GmNAC30 mostraram uma identidade superior a 60% para todas elas, sendo ANAC102 a que mais se assemelhou a GmNAC30, apresentando 71,3% de identidade de sequência com essa proteína, seguida por ATAF2 com 68,8% de identidade (Figura 4B).

A



B

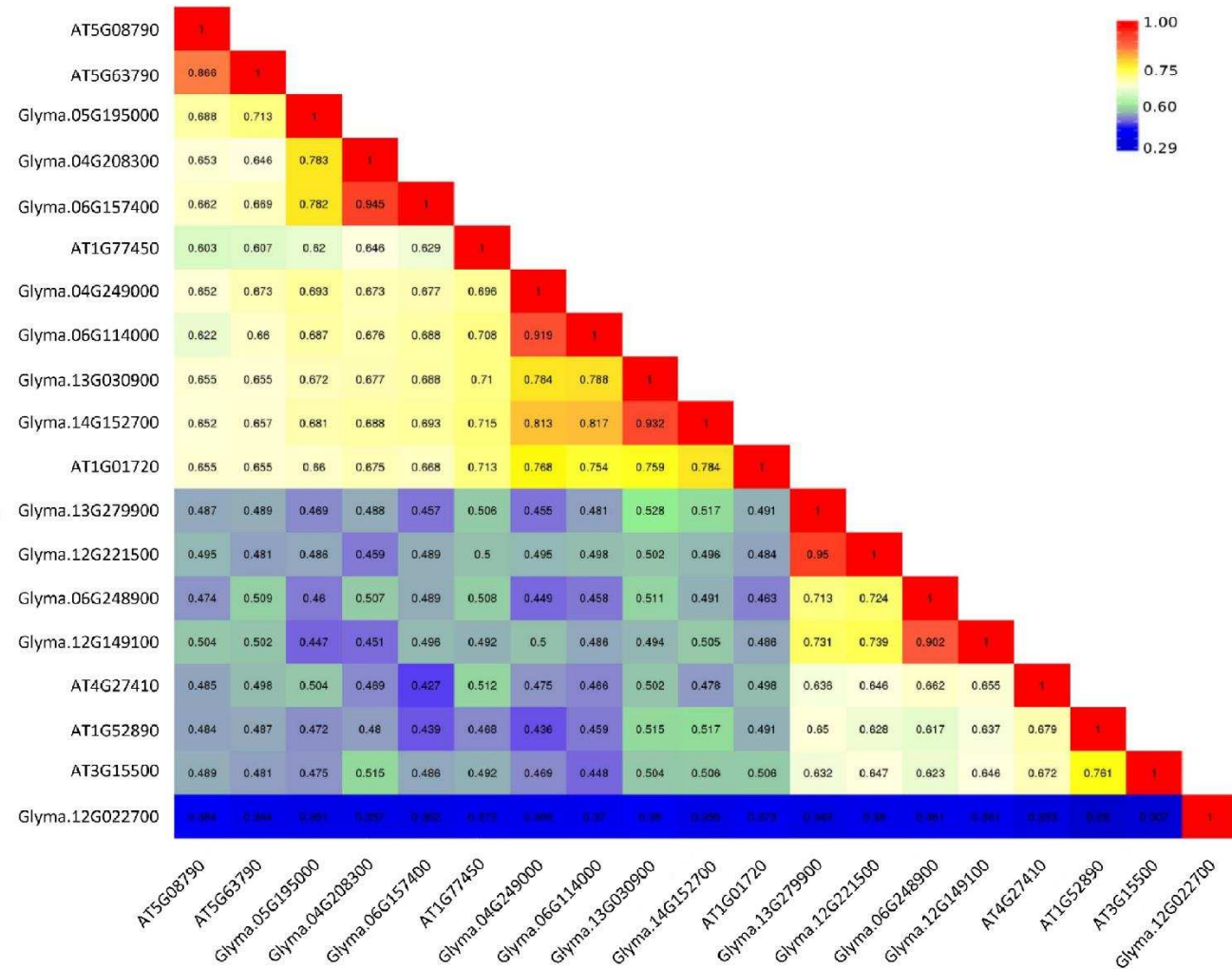


Figura 4. Expansão da subfamília SNAC-A (ATAF) em soja. (A) Árvore filogenética da subfamília de SNAC-A (ATAF) de soja e Arabidopsis. Os genes NAC de soja foram comparados com os genes SNAC-A de Arabidopsis, resultando em um agrupamento com alta estabilidade interna. Os genes de soja estão representados em azul e os de Arabidopsis em vermelho. (B) Identidade de sequência dos componentes da subfamília SNAC-A (ATAF). As sequências de aminoácidos de ortólogos de GmNAC30 foram alinhadas com todos os possíveis pares de sequências usando o algoritmo Muscle. Em seguida, os escores de identidade foram calculados como $1 - (M/N)$. Baseando-se na matriz de identidade de sequência, uma árvore filogenética enraizada foi obtida utilizando o método neighbour joining para agrupar sequências com base em escores de similaridade. O plot da matriz de identidade foi obtido utilizando pacote *ggplot* do software R. A cor vermelha indica maior identidade de sequência e a cor azul menor identidade.

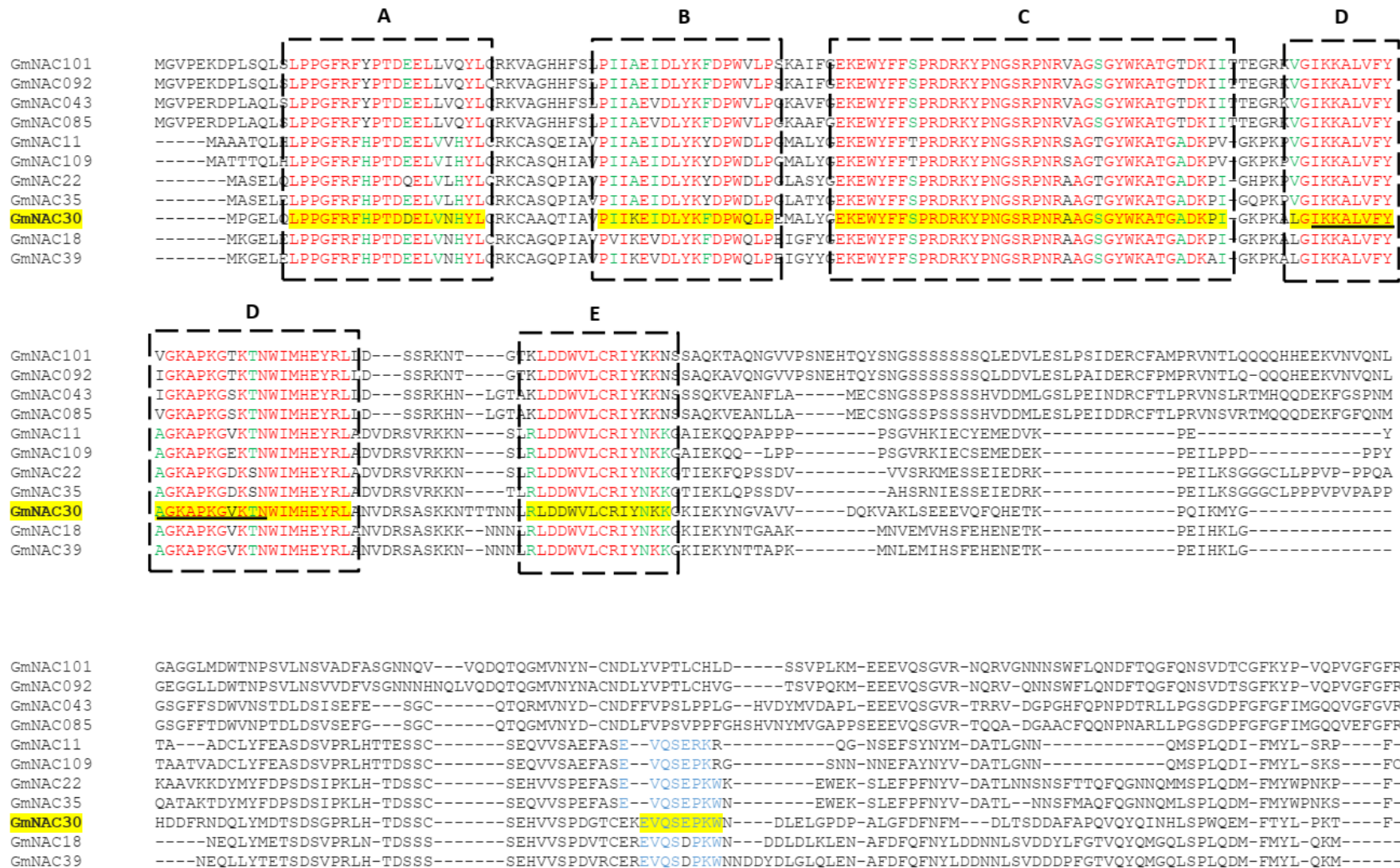


Figura 5. Conservação do domínio NAC entre os membros da subfamília SNAC-A (ATAF) de soja. GmNAC030 foi utilizado como protótipo em múltiplo alinhamento das sequências dos membros da subfamília SNAC-A de soja. Letras em vermelho representam resíduos conservados em todas as sequências avaliadas. Em verde, aqueles que estão presentes no mínimo em 7 sequências simultaneamente. O sinal de localização nuclear está sublinhado em preto e se sobrepõe ao motivo D. O motivo conservado de ativação transcricional encontrado em membros do grupo ATAF é mostrado em azul na região C-terminal de ativação transcricional (TAR). Os quadros pontilhados demarcam os cinco motivos (A-E) que compõem o domínio NAC.

Consistente com esses dados, ATAF2 e ANAC102 foram os que se agruparam mais próximos a GmNAC30 em análises filogenéticas (Figuras 3 e 4A). Coletivamente, as análises realizadas indicam uma maior probabilidade de que ATAF2 ou ANAC102 sejam os possíveis ortólogos de GmNAC30, o que difere dos dados apresentados anteriormente na literatura, que apontavam para ATAF1 (SILVA *et al.*, 2015). No entanto, ressalta-se aqui a grande similaridade entre essas quatro proteínas, o que dificulta determinar precisamente ortólogos de GmNAC30.

A subfamília ATAF apresenta um destaque histórico, pois inclui muitos dos primeiros fatores de transcrição NACs descritos na literatura. Um dos grupos que compõe essa subfamília inclui os fatores de transcrição NAC responsivos ao estresse, ou SNACs. Os componentes desse grupo estão intimamente relacionados e tem sido demonstrado seu envolvimento em resposta tanto a estresses bióticos quanto abióticos. Em análises filogenéticas mais detalhadas constatou-se que os genes SNACs de *Arabidopsis* podem ser subdivididos em dois ramos principais, SNAC-A e SNAC-B (TAKASAKI *et al.*, 2015).

Estudos demonstram que muitos dos genes SNAC-B mediam vias de sinalização relacionadas à senescência. Um exemplo é o TF ANAC29/AtNAP, que tem sido descrito como um regulador positivo de senescência foliar (GUO e GAN, 2006). ANAC056/NARS1, outro integrante do grupo SNAC-B, atua em conjunto com NARS2 no controle de senescência e PCD em tecidos reprodutivos em *Arabidopsis* (KUNIEDA *et al.*, 2008). O subgrupo SNAC-A, por outro lado, tem sido relacionado principalmente à regulação da expressão de genes responsivos a estresses abióticos, particularmente a ABA (NAKASHIMA *et al.*, 2012; TAKASAKI *et al.*, 2015). Em *Arabidopsis* esse grupo é composto por sete fatores de transcrição, sendo eles ANAC019, ANAC055, ANAC072/RD26, ATAF1/ANAC002, ATAF2/ANAC081, ANAC102 e ANAC032 (TAKASAKI *et al.*, 2015), os quais têm sido extensivamente caracterizados.

Em uma triagem realizada por monohíbrido em leveduras, os fatores de transcrição ANAC019, ANAC055 e ANAC072 foram isolados por sua capacidade de ligação ao promotor de ERD1 (Early Responsive to Dehydration 1), o qual é induzido não apenas por desidratação, mas também por senescência natural e senescência induzida por escuro (TRAN *et al.*, 2004, SIMPSON *et al.*, 2003; NAKASHIMA *et al.*, 1997). Esses genes estão envolvidos na resposta a múltiplos estresses abióticos e no processo de senescência foliar idade-dependente (TRAN *et al.*, 2004; HICKMAN *et al.*, 2013).

Excetuando-se *ATAF2*, todos os genes que compõem o grupo SNAC-A em *Arabidopsis* são induzidos por ABA (TAKASAKI *et al.*, 2015; DELESSERT *et al.*, 2005). *ATAF2* está relacionado a respostas a estresses mecânicos e a hormônios relacionados como metil jasmonato (MeJA) e ácido salicílico (AS) (DELESSERT *et al.*, 2005; HUH *et al.*, 2012). Esse TF tem sido descrito como um importante repressor de genes relacionados a patogêneses, estando envolvido na maior susceptibilidade de plantas ao fungo *Fusarium oxysporum* (DELESSERT *et al.*, 2005). Além disso, *ATAF2* atua na modulação do crescimento de raízes por meio da regulação do catabolismo de brassinosteróides (PENG *et al.*, 2015). Dessa forma, esse TF se destaca como um regulador central da defesa de plantas, metabolismo de hormônios e integrador entre o estresse mecânico e a defesa a patógenos (HUH *et al.*, 2012; PENG *et al.*, 2015; WANG e CULVER, 2012).

Assim como *ATAF2*, o fator de transcrição *ATAF1* tem sido relacionado à integração de estresses bióticos e abióticos. *ATAF1* também responde ao estresse mecânico e atua como um regulador negativo da resposta de defesa contra diferentes tipos de patógenos, sendo que sua superexpressão está relacionada a uma maior susceptibilidade da planta a fungos necrotróficos e patógenos bacterianos (CHRISTIANSON *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2009; WU *et al.*, 2009). Plantas superexpressando o gene *ATAF1* são mais sensíveis aos estresses oxidativo e salino (WU *et al.*, 2009). *ATAF1* também está relacionado à resposta a seca, no entanto, dados disponíveis na literatura são contrastantes quanto a forma como esse gene influencia na tolerância ou susceptibilidade de plantas a esse estresse (LU *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2009). Além disso, *ATAF1* atua como um ativador transcricional central da senescência, acoplando vias de sinalização relacionadas ao estresse a cascatas transcricionais relacionadas à fotossíntese e senescência (GARAPATI *et al.*, 2015).

ANAC102 é induzido por seca, frio e estresse salino; além disso, exerce um papel fundamental como regulador da germinação de sementes em baixos níveis de oxigênio, o que implica em um importante papel de *ANAC102* na germinação de sementes em condições de alagamento (CHRISTIANSON *et al.*, 2009; CHRISTIANSON *et al.*, 2010). O fator de transcrição *ANAC032*, foi funcionalmente descrito apenas recentemente, e assim como outros componentes da subfamília SNAC-A, é induzido por múltiplos estresses. Tem sido demonstrado que *ANAC032* está envolvido na regulação da resposta de plantas a patógenos, sendo responsável por conferir resistência a *Arabidopsis* contra *P. syringae* pv. *tomato* DC300 (*Pst*) (ALLU *et al.*, 2016). Além disso, *ANAC032* foi induzido por tratamento com MeJA e AS. Esse fator de transcrição tem sido relacionado

também à repressão da biossíntese de antocianinas em resposta a alta concentração de sacarose e a estresses oxidativo e abióticos, além de estar envolvido na regulação da senescência natural e induzida por estresse em *A. thaliana* (MAHMOOD *et al.*, 2016a; MAHMOOD *et al.*, 2016b).

Em soja, GmNAC30 e GmNAC011 (Glyma.13G030900, inicialmente descrito como GmNAC020), correspondem aos únicos membros da subfamília SNAC-A previamente caracterizados (MENDES *et al.*, 2013; HAO *et al.*, 2011). GmNAC011 tem sido descrito como uma proteína responsiva a estresses, que confere tolerância a salinidade e frio e está envolvida na formação de raízes (HAO *et al.*, 2011). GmNAC030, conforme anteriormente descrito nesta investigação, é um componente da via de sinalização de morte celular mediada por NRP/DCDs e compartilha diversas propriedades biológicas com ATAF1 e ATAF2 (MENDES *et al.*, 2013). GmNAC30 é induzido por estresses bióticos e abióticos, sinalização por hormônios, sendo também envolvido tanto em senescência foliar natural quanto em senescência induzida por estresses (MENDES *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2014; PIMENTA *et al.*, 2016).

Os fatores de transcrição que compõe a subfamília SNAC-A (ATAF) possuem, portanto, um importante papel na resposta de plantas aos mais variados estresses, o que ressalta a relevância de estudos funcionais que visam caracterizar e compreender componentes desse grupo em espécies cultiváveis. Condizente com a relevância desses TF na resposta de plantas a estresses múltiplos, ao analisar a subfamília SNAC-A em soja, foi observada uma expansão do número de membros em relação a *A. thaliana* (Figura 4A).

Em soja, foram observados 11 membros pertencentes a essa subfamília, sendo que 10 deles se agruparam filogeneticamente em pares. Uma das possíveis razões para a expansão da subfamília e manutenção desses genes, mesmo quando duplicados, seria a pressão seletiva que a soja, assim como outras espécies cultiváveis, sofre durante o processo de seleção artificial. Nesse processo, genes capazes de conferir tolerância a estresses, devido a sua importância para a adaptabilidade e sobrevivência da planta, são selecionados e mantidos. Destaca-se assim a relevância de se aumentar o nosso conhecimento com relação aos fatores de transcrição pertencentes a esse grupo em espécies cultiváveis.

4.2. Os componentes da subfamília SNAC-A (ATAF) de soja são induzidos por múltiplos estresses

Conforme discutido anteriormente, os fatores de transcrição pertencentes ao subgrupo SNAC-A (ATAF) são responsivos a múltiplos estresses. No entanto, pouco se sabe acerca dos componentes desse grupo em soja. Diante disso, propôs-se aqui verificar o perfil de resposta de alguns desses TF a diferentes estresses através de análises de qRT-PCR.

Para isso, plantas de soja no estágio de desenvolvimento V3/V4 foram submetidas a 0,5h, 2h e 12h de estresse com PEG, tunicamicina e ácido salicílico (AS), que simulam estresse osmótico, estresse do retículo endoplasmático (RE) e estresse biótico, respectivamente. A fim de verificar a eficiência dos tratamentos, foram usados como marcadores os genes *SMP* (*seed maturation protein*), *CNX* (calnexina), *PDI* (*protein disulfide isomerase*) e *PR-4* (*NPR-4*). O gene *SMP* é um marcador de estresse osmótico, *CNX* e *PDI* marcadores de estresse no RE, enquanto *PR-4* um marcador de estresse biótico. Foram feitas as reações com os cDNAs preparados a partir das amostras tratadas, constatando a efetividade dos tratamentos (Figura 6).

Além de *GmNAC30*, foram selecionados para os ensaios os genes *GmNAC011*, *GmNAC018*, *GmNAC022*, *GmNAC035*, *GmNAC039* e *GmNAC109* por se agruparem filogeneticamente mais próximos a *GmNAC30*. Esses genes apresentam alta similaridade de sequência entre si, sendo que, em estudos anteriores foram considerados como parálogos de *GmNAC30* (MENDES *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015). Diante disso, para garantir a especificidade das reações, os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados de modo que pelo menos um deles fosse específico unicamente para o seu gene alvo em sua extremidade 3'OH. Foram realizados testes que demonstraram a efetividade e especificidade dos primers utilizados. Exceto os oligonucleotídeos desenhados para o gene *GmNAC109*, que apresentaram curva de dissociação dispersa e, portanto, não foram utilizados neste estudo, os demais conjuntos de primers apresentaram curvas de dissociação consistentes com alinhamento específico para um gene único (Figura 7).

Para as análises posteriores, foram selecionados os tempos de 0,5h e 2h para os estresses com AS e TUN e os tempos de 2 e 12h para o estresse com PEG. A Figura 8 mostra o padrão de expressão observado para os genes avaliados. Foi previamente demonstrado que o gene *GmNAC30*, como componente da via de morte celular mediada por NRPs, responde aos estresses osmótico e do RE (MENDES *et al.*, 2013). Essa via

integra e propaga um sinal de morte celular em resposta a esses estresses quando prolongados (REIS e FONTES, 2012). Sendo um componente a jusante dessa via, estudos anteriores focaram em demonstrar a expressão tardia de *GmNAC30* em resposta a esses estresses. Nas condições experimentais utilizadas no presente trabalho, foi observado, de forma surpreendente, uma indução precoce de *GmNAC30*, que no caso do tratamento com tunicamicina, foi seguida pela drástica redução de expressão em 2h de tratamento.

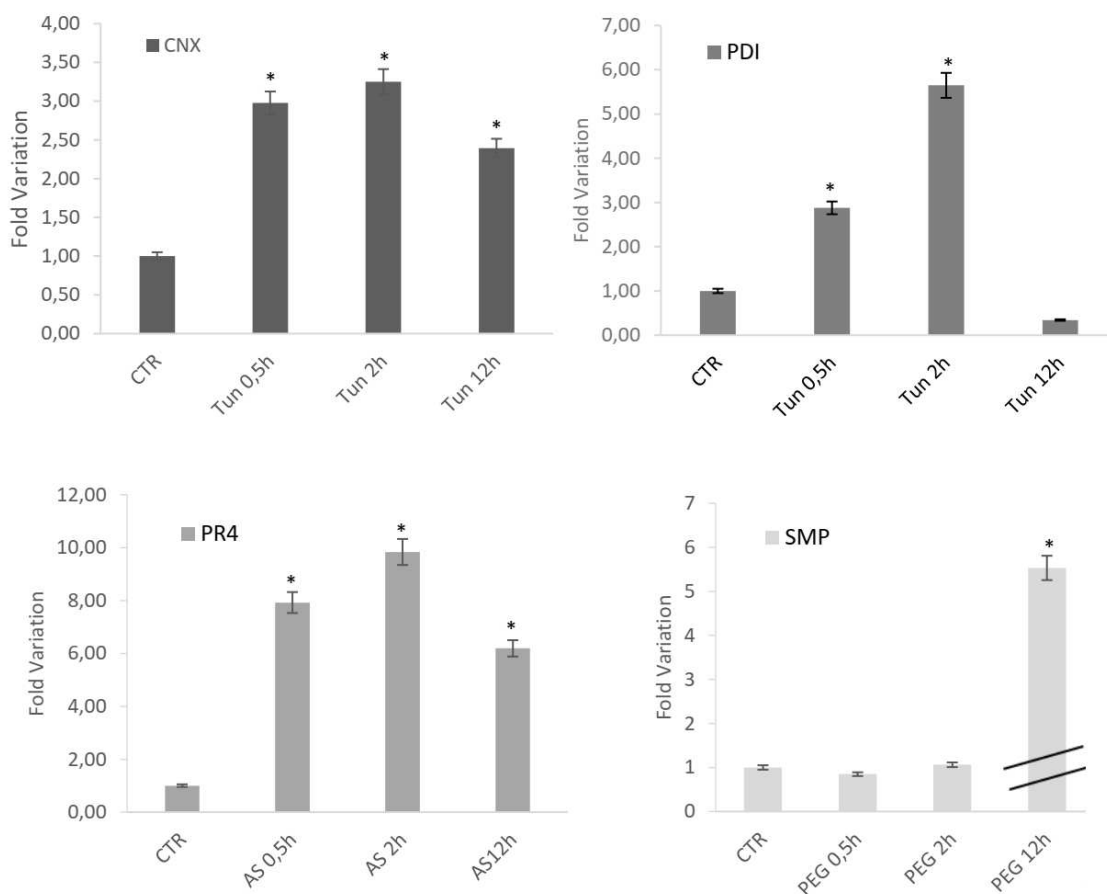


Figura 6. Expressão de genes marcadores associados a estresse em soja. Plantas de soja em estágio V3-V4 foram submetidas ao estresse com PEG (PM 8.000 – 0,5 % v/v), tunicamicina (5 µg/mL) ou ácido salicílico (5 mM), por 0,5h, 2h ou 12h. *CNX* (calnexina) e *PDI* (Proteína dissulfeto isomerase) foram usados como marcadores para o estresse no retículo endoplasmático. *PR-4* (*pathogenesis-related gene*) foi utilizado como marcador de estresse biótico e *SMP* (*seed maturation protein*) como marcador do estresse por PEG. Dimetilsulfoxido (DMSO) foi utilizado como controle para o tratamento com tunicamicina. O nível de transcritos dos genes selecionados, como indicado, foi quantificado por qRT-PCR. A expressão gênica foi calculada usando o método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e o gene *UNK2* como controle endógeno. As barras indicam o erro padrão e os asteriscos indicam diferença significativa pelo teste-t ($p < 0,05$, $n=4$). CTR=controle; Tun= tunicamicina; AS=ácido salicílico; PEG=polietilenoglicol.

Em conjunto com as informações disponíveis na literatura, os dados aqui obtidos sugerem uma oscilação no perfil de expressão de *GmNAC30*, que possivelmente é

induzido de forma precoce em resposta aos estresses até que a planta ative mecanismos para tentar reestabelecer o equilíbrio celular, como a ativação da via UPR. Em seguida ocorre a diminuição da expressão desse gene até o momento em que, caso não seja reestabelecida a homeostase, é ativada a via de PCD e o gene é induzido novamente.

Além disso, *GmNAC30* foi reprimido em resposta a 2h de tratamento com AS, o que está em contraste marcante com os resultados previamente reportados (PIMENTA *et al.*, 2016). Em resposta ao tratamento por AS, foi previamente demonstrado que *GmNAC30* apresenta uma cinética de indução precoce, atingindo um nível máximo de indução 1 hora após o tratamento, e este platô persiste até o decaimento observado 12 horas após o tratamento. No entanto, nos estudos conduzidos por Pimenta et al. (2016) o tratamento de estresse biótico foi realizado em plântulas de soja (estádio VC), enquanto que no presente trabalho, para os tratamentos de estresse, foram utilizadas plantas entre os estádios V3 e V4. Portanto, é provável que a divergência dos resultados obtidos se deva à diferença entre os estádios de desenvolvimento das plantas utilizadas em cada experimento.

Os genes *GmNAC18* e *GmNAC39* apresentaram um padrão de expressão muito similar. Ambos os genes exibiram uma cinética tardia de resposta a PEG, tendo sido induzidos 12 h após o tratamento com PEG, mas não responderam a 2h de tratamento. Na simulação de estresse no retículo, os dois genes foram rapidamente induzidos a 0,5h de tratamento e apresentaram uma tendência a diminuição da expressão após 2h de tratamento. Quando simulado o estresse biótico, ambos apresentaram um perfil de repressão após 2h de tratamento com AS, no entanto a diferença foi significativa apenas para o gene *GmNAC18*. Esses resultados condizem com a característica duplicação de genes de soja, uma vez que, filogeneticamente, esses genes se agrupam como um par, sendo assim, um seria possivelmente uma cópia do outro que foi mantida no genoma. Entretanto, a diferença sutil da resposta à AS entre estes possíveis parálogos, agrupados em pares, pode indicar que os genes possuam funções parcialmente redundantes, mas ligeiramente diversas. Resultados similares de diferenças em expressão gênica já foram observados para GmNACs ancorados em membranas que se apresentam em pares (LI *et al.*, 2016). Análises funcional e evolucionária de GmNACs, ancorados em membranas, demonstraram que os genes duplicados divergem funcionalmente, o que deve contribuir para uma pressão seletiva para retenção no genoma da soja destes genes duplicados (LI *et al.*, 2016).

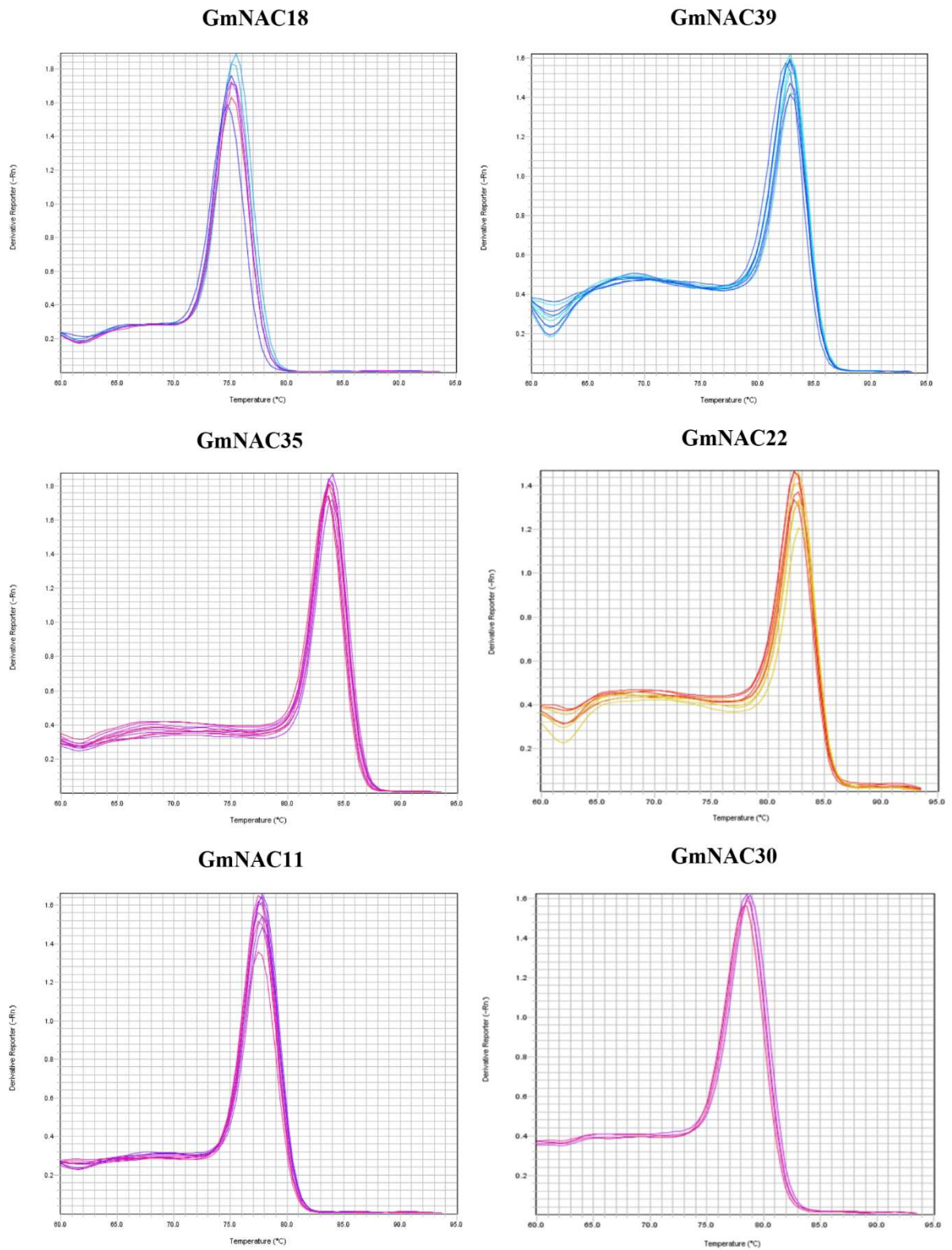


Figura 7. Curvas de dissociação dos oligonucleotídeos utilizados para a quantificação da expressão dos genes de soja da família SNAC-A (ATAF). Foi realizado o teste de eficiência dos oligonucleotídeos utilizando quantidades cDNA variando de 0,08ng a 50ng. A curva de dissociação foi calculada, sendo observado um único pico, que comprova a especificidade dos primers.

Similarmente, os genes *GmNAC35* e *GmNAC22*, que também são genes duplicados, apresentaram um perfil de expressão correspondente. Ambos foram induzidos por 0,5h de tratamento com TUN e apresentaram uma tendência de repressão após 2h de tratamento. Para o tratamento com AS, após 2h foi observada uma tendência à redução da expressão a qual, no entanto, foi significativa estatisticamente apenas para o gene *GmNAC22*. Em plantas submetidas a estresse osmótico, foi observada uma tendência de redução da expressão após 2h de tratamento e forte indução após 12h.

Em estudo realizado por Le *et al.* (2011), ao submeter plantas de soja a estresse por desidratação, foi observada uma progressiva repressão do gene *GmNAC22* para os tempos de 2h e 10h de estresse, divergindo dos resultados apresentados nesta investigação. Provavelmente, estes resultados divergentes se devem a diferenças no tratamento de desidratação empregada em cada estudo. Enquanto que, nesta investigação, a desidratação nas plantas foi induzida por PEG, nos estudos conduzidos por Le *et al.* (2011), para a desidratação, plântulas de soja foram transferidas para papéis de filtro e secas naturalmente a 25°C e 60% de umidade relativa. A cinética do desequilíbrio osmótico provocada por estes tratamentos é muito diferente e, portanto, estes resultados não podem ser comparados diretamente.

Diferentemente dos outros genes avaliados, *GmNAC11* foi induzido em todas as condições estudadas, porém com cinéticas de indução diferentes. A indução máxima em resposta aos tratamentos com TUN e AS ocorreu com cinética precoce a 0,5h após os tratamentos. Entretanto, esse FT apresentou uma maior resposta ao estresse osmótico, com o pico máximo de indução às 12h de tratamento com PEG, condição em que teve sua expressão mais de 20 vezes aumentada em relação ao controle.

De forma geral os dados indicam que os pares *GmNAC18/GmNAC39* e *GmNAC35/GmNAC22*, provavelmente apresentam funções que se sobrepõem e complementam parcialmente, podendo ser ligeiramente distintas. No entanto, ao considerar esses pares e os FT *GmNAC11* e *GmNAC30* é possível notar que, mesmo diante da alta conservação de sequência dessas proteínas, cada uma apresenta suas particularidades no ajuste fino de suas respostas, indicando funções específicas e coordenadas na resposta ao estresse.

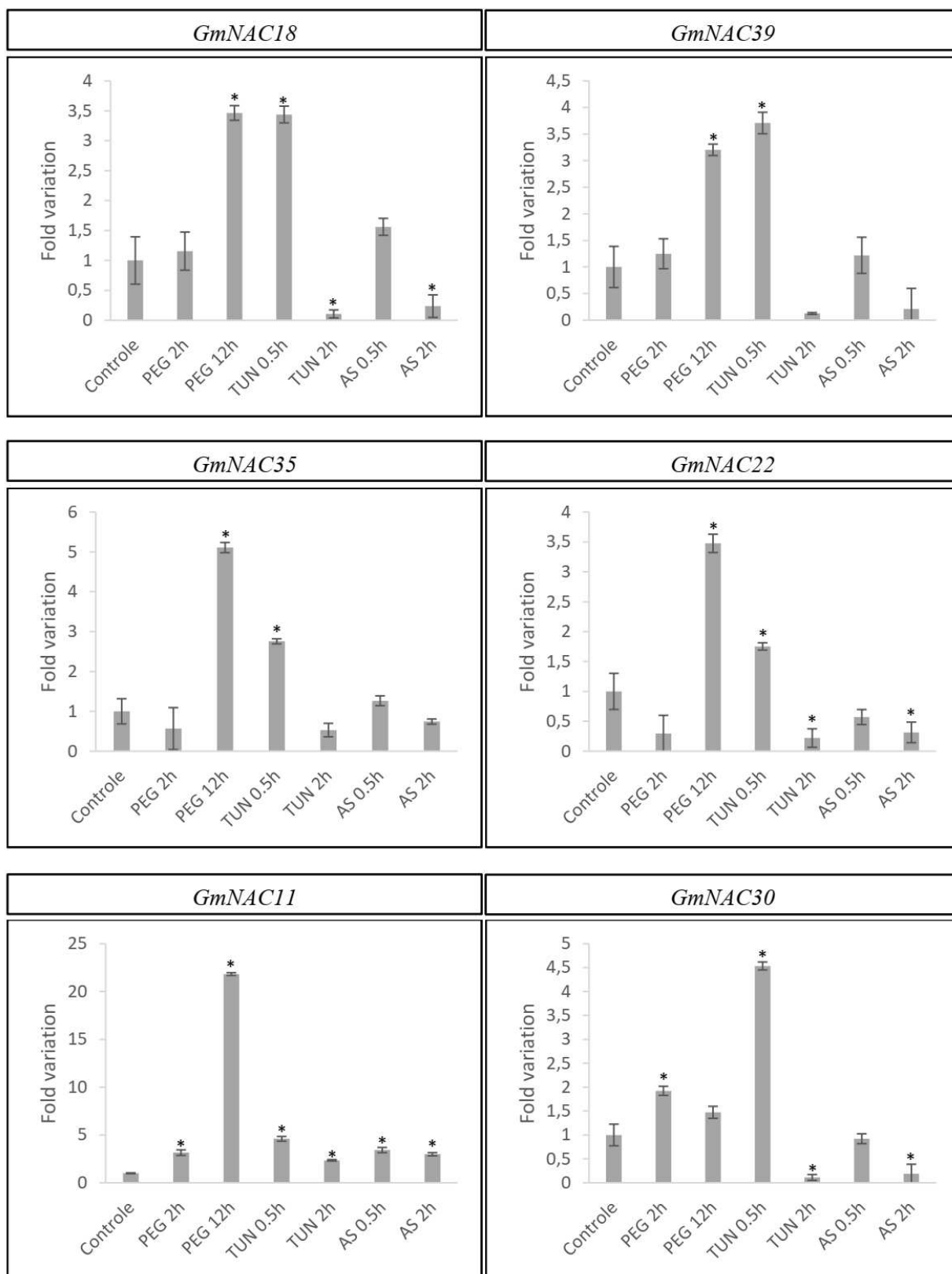


Figura 8. Os componentes indicados da subfamília SNAC-A (ATAF) de soja são induzidos por múltiplos estresses. Perfil de expressão de 6 genes da subfamília SNAC-A de soja quando submetidos a estresses por TUN, PEG ou AS. Plantas no estágio V3/V4 de desenvolvimento foram submetidas a tratamento por 0,5h e 2h com TUN (5µg/mL) ou AS (5mM) e com tratamento com PEG (PM 8000 – 0,5% v/v) por 2h e 12h. DMSO foi utilizado como controle para tratamento com tunicamicina. O gene *UNK2* foi escolhido como controle endógeno. A expressão relativa dos genes foi quantificada utilizando o método comparativo $2^{-\Delta\Delta C_t}$. As barras indicam o erro padrão e os asteriscos indicam significância estatística pelo teste-t ($p < 0,05$, $n = 4$).

4.3. O fator de transcrição ATAF1 não interage com ANAC036 pelo sistema de duplo-híbrido em leveduras

Um dos objetivos do presente trabalho foi desvendar o TF que exerceria, em *Arabidopsis*, a função de GmNAC30 na via de morte celular mediada por NRPs. Análises *in silico* disponíveis na literatura indicavam ATAF1 como possível ortólogo de GmNAC30; no entanto, estudos funcionais ainda precisavam ser realizados a fim de comprovar essa hipótese. Dessa forma, esse fator de transcrição foi inicialmente escolhido como alvo para estudo desse trabalho.

Os fatores de transcrição desempenham sua função essencialmente no núcleo, onde se ligam aos cis-elementos em que atuam e assim regulam a expressão de seus genes alvo. Condizendo com essa característica, foi verificado aqui, por microscopia confocal, que ATAF1 se localiza no núcleo quando expresso transientemente em folhas de *Nicotiana benthamiana* (Figura 9), conforme mostrado previamente (LU *et al.*, 2007).



Figura 9. Localização subcelular de ATAF1. Folhas de *N. benthamiana* foram infiltradas com *Agrobacterium* transformada com a construção 35S:ATAF1-GFP. A localização subcelular da proteína foi monitorada por microscopia confocal 72h após infiltração. A co-localização da proteína fusionada ao GFP com o marcador nuclear AtWWP1-mCherry é mostrada na imagem mesclada (*merged*). Barras de escala = 10µm.

Tipicamente, as proteínas NAC possuem um domínio N-terminal altamente conservado, que exibe a capacidade de se ligar ao DNA e a capacidade de dimerização (KIM *et al.*, 2016; CHRISTIANSON *et al.*, 2010). Esses fatores podem interagir na forma de homo ou heterodímeros e essa interação usualmente é necessária para que os transfatores envolvidos possam realizar sua função ativando a expressão gênica. Quando formam homodímeros, alguns fatores de transcrição podem transativar a expressão de genes sem a necessidade de outros TF ou proteínas acessórias. Portanto, foi realizado um

ensaio de transativação em leveduras a fim de verificar a capacidade de transativação de ATAF1 e ANAC036.

ATAF1, assim como seu possível ortólogo GmNAC30 e conforme já esperado de acordo com os dados disponíveis na literatura (LU *et al.*, 2007), apresentou capacidade de transativação, sendo observado crescimento de leveduras transformadas com a construção BD-ATAF1 em meio SD-L-H mesmo em concentrações de 10mM de 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) (Figura 10). ANAC036 por outro lado comportou-se conforme seu ortólogo GmNAC081, não apresentando capacidade de transativação (Figura 10).

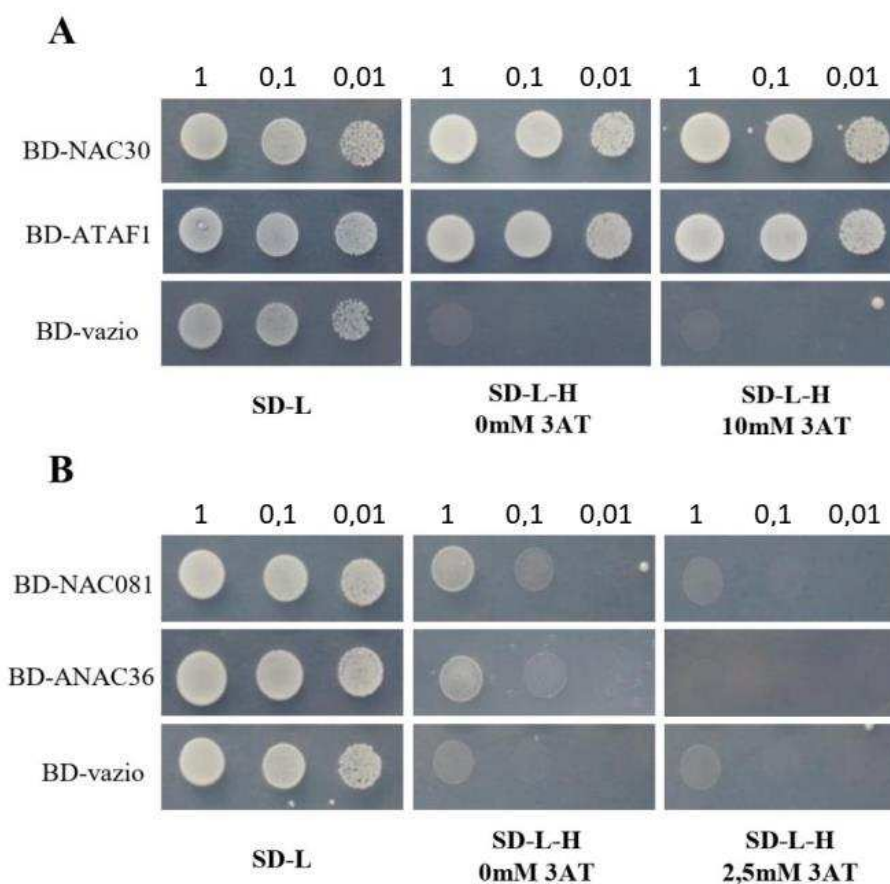


Figura 10. Ensaio de transativação de ATAF1 e ANAC036 em leveduras. Os plasmídeos contendo as fusões BD-GAL4 como indicado na figura e o vetor vazio (pDEST32) foram introduzidos separadamente na cepa de levedura AH109. Foram feitas diluições da cultura para as densidades óticas de 1, 0,1 e 0,01. Os transformantes foram incubados por 4 dias a 28°C em meio SD na ausência dos aminoácidos indicados. (A) Transativação de BD-ATAF1 e BD-GmNAC30 em meio suplementado com 0 ou 10mM de 3AT (3-aminotriazol). (B) BD-ANAC36 e BD-GmNAC081 não exibem atividade transcricional em leveduras. O meio foi suplementado com 0 ou 2,5mM de 3AT.

Uma reanotação no genoma de *Arabidopsis* ocorrida em 2017 (CHENG *et al.*, 2017) levou a uma alteração na extensão da região codificante do gene *ANAC036* e este, que antes possuía 753pb, teve sua sequência aumentada em 78pb de modo que o gene

passou a ser representado por um fragmento de 831pb (Figura 11). Dessa forma, em todo trabalho aqui realizado foi utilizada uma porção truncada de *ANAC036*, que abrange dos nucleotídeos 79 a 828 desse gene, conforme ilustrado na Figura 11. Essa sequência de 78pb ausente nos clones aqui utilizados inclui uma porção do domínio NAC dessa proteína, que aparentemente não afeta sua função, uma vez que em experimentos realizados por Reis et al. (2016) a proteína truncada foi funcional.

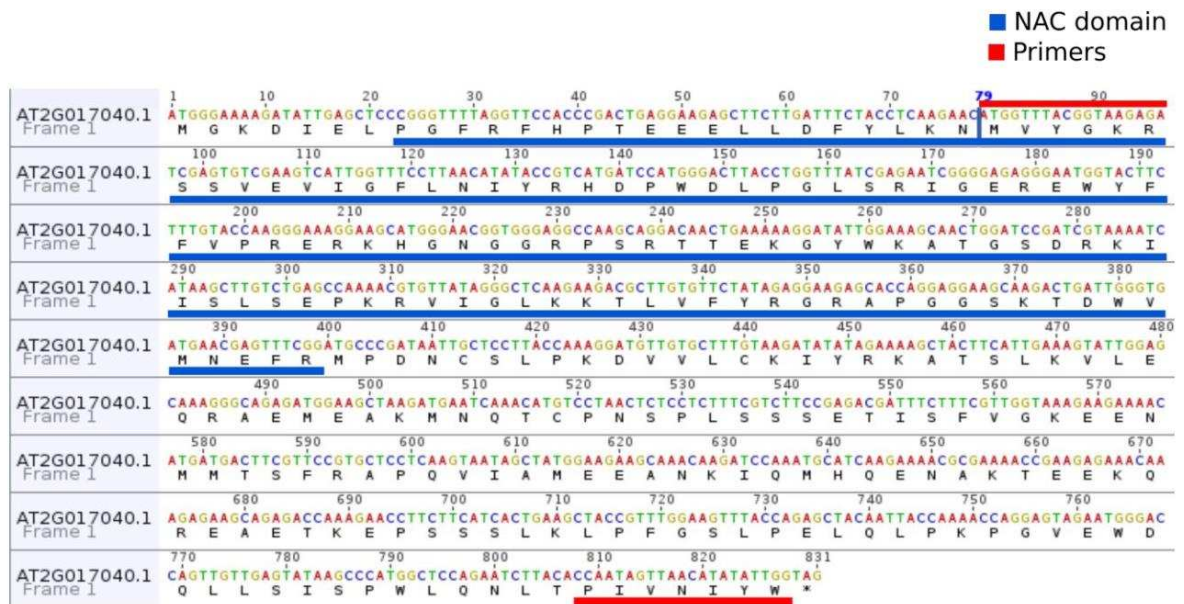


Figura 11. Sequência reanotada de *ANAC036*. Foi feito o alinhamento dos oligonucleotídeos utilizados para a clonagem de *ANAC036* (em vermelho) com a sequência atual do gene, indicando uma diferença de 79 nt entre a região amplificada e a CDS completa. Em azul está delimitado o domínio NAC da proteína *ANAC036*.

Sendo ATAF1 possível ortólogo de GmNAC30, que interage funcionalmente com GmNAC081 (MENDES *et al.*, 2013), espera-se que ATAF1 seja capaz de interagir com *ANAC036* (descrito como o ortólogo de GmNAC081 em *Arabidopsis*). Dentro dessa premissa, foi realizado o ensaio de duplo-híbrido a fim de testar a interação ATAF1-*ANAC036*. Além disso, uma vez que os fatores de transcrição NAC apresentam uma grande conservação de sequência e estrutura entre as espécies, foram testadas também as interações ATAF1-GmNAC081 e *ANAC036*-GmNAC30 (Figura 12).

Pelo sistema de duplo-híbrido em leveduras, não foi verificada interação entre ATAF1-*ANAC036*, uma vez que não houve crescimento significativo em meio seletivo de células co-transformadas com AD-ATAF1 e BD-*ANAC036*, similarmente ao observado para os controles negativos transformados com os vetores vazios. Não foi observada também interação entre *ANAC036*-GmNAC30. No entanto, para a combinação

ATAF1-GmNAC081, foi verificada uma interação fraca (apenas em 0mM de 3AT), que se assemelhou muito ao controle positivo de interação, em que foi utilizada a combinação GmNAC30-GmNAC081 (Figura 12).

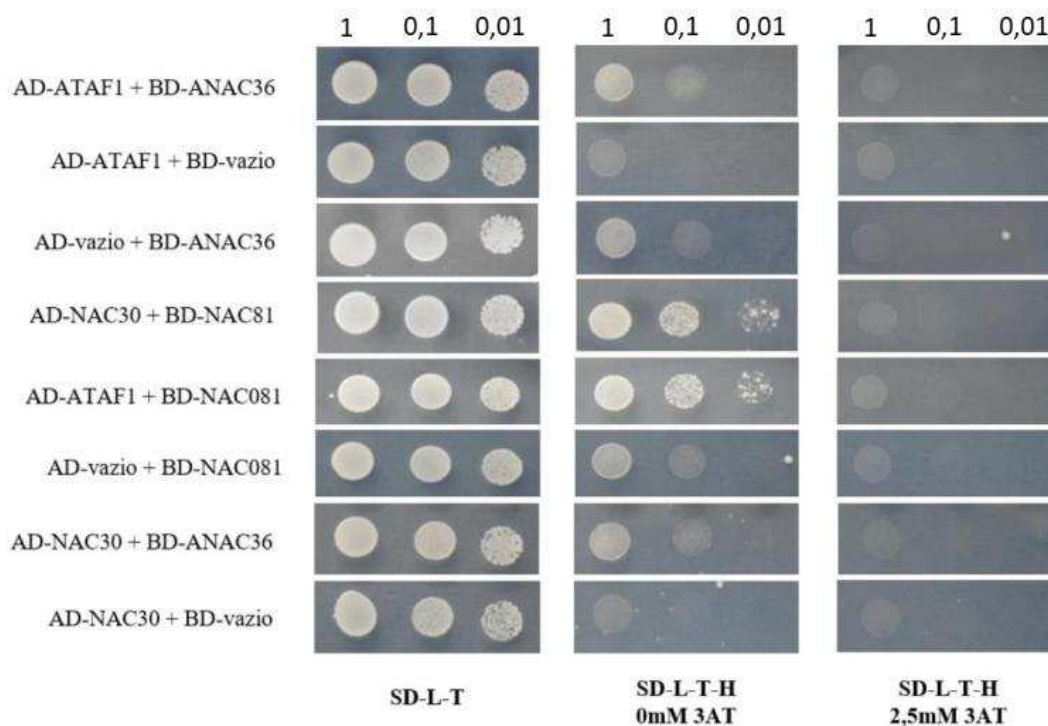


Figura 12. Ensaio de interação proteína-proteína pelo sistema duplo-híbrido de leveduras. ATAF1 e GmNAC30 foram expressos fusionados ao domínio de ativação de GAL4 (AD) em leveduras, e ANAC036 e GmNAC081 foram expressos fusionados ao domínio de ligação ao DNA (BD). A interação entre as proteínas testadas foi examinada monitorando o crescimento em meio SD-L-T-H e meio SD-L-T-H suplementado com 2,5mM de 3AT após 4 dias de incubação. Foram feitas diluições da cultura para as densidades óticas de 1, 0,1 e 0,01. As co-transformações com os vetores pDEST22 ou pDEST32 vazios foram utilizadas como controle negativo.

É possível destacar três explicações plausíveis para o fato de não ter sido observada interação entre ATAF1 e ANAC036, (i) uma consequência da expressão das proteínas em um sistema heterólogo, (ii) a interação realmente não ocorre ou (iii) a falta da porção inicial de 78 nucleotídeos de ANAC036 pode estar influenciando na interação das proteínas. Porém, uma vez que ATAF1 interagiu fracamente com GmNAC081 é possível que seja ortólogo de GmNAC30. Entretanto, para designar conclusivamente uma função de ATAF1 como ortólogo de GmNAC030 na via de morte celular mediada por NRPs, experimentos complementares são necessários.

4.4. ATAF1 pode ser um inibidor da via de morte celular mediada por NRPs

Como um suposto componente da via de sinalização mediada por proteínas NRPs, foi examinado se *ATAF1* responderia aos estresses osmótico e no RE. Para isso, plântulas de *Arabidopsis* de 15 dias foram submetidas a tratamento com PEG (10% p/v) e tunicamicina (2,5 µg/mL) por 8h (também com 24h para PEG) e a expressão gênica foi verificada por qRT-PCR. A efetividade dos tratamentos foi monitorada através da expressão do gene marcador de estresse no retículo endoplasmático *CNX* e do gene marcador de estresse osmótico *RAB18* após 8h de tratamento (Figura 13A, B). Nessas condições, *ATAF1* foi induzido por estresse osmótico, tanto após 8h quanto após 24h de tratamento, no entanto não apresentou variação na expressão em resposta ao tratamento com tunicamicina (Figura 13C). Esse resultado não suporta o argumento de que *ATAF1*, seja o ortólogo de *GmNAC30*.

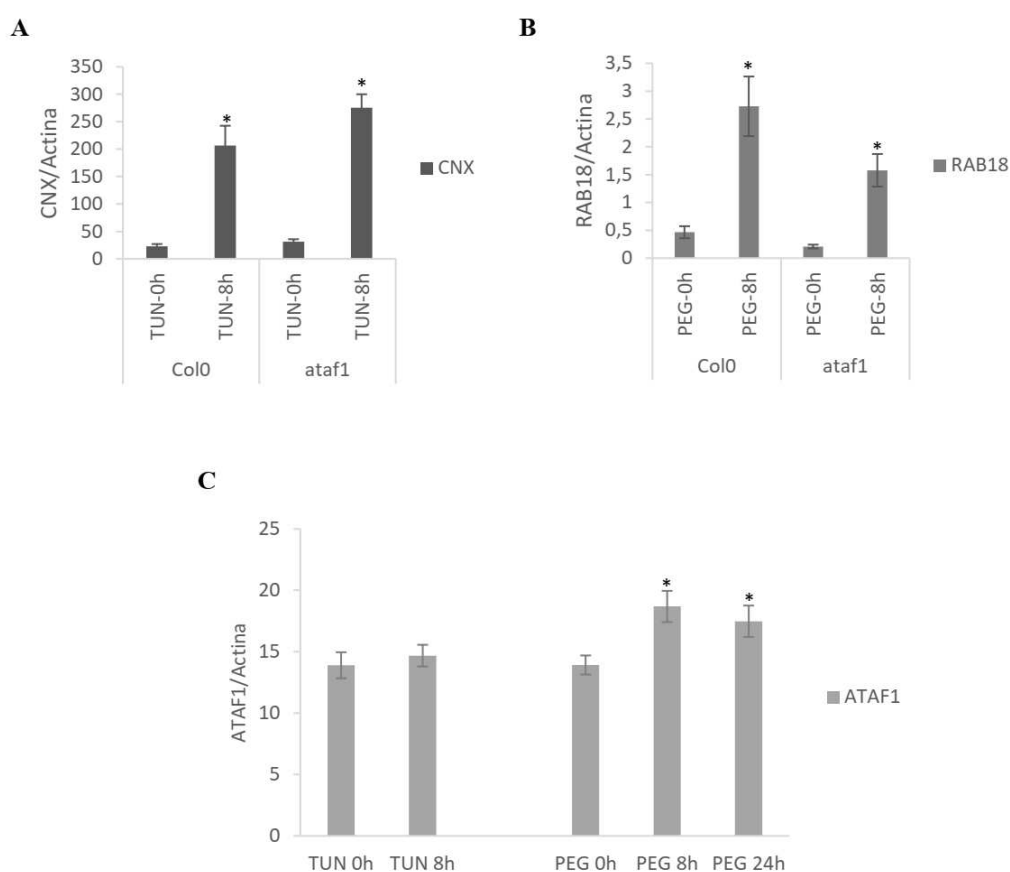


Figura 13. Expressão de ATAF1 em resposta a estresse osmótico e estresse no retículo endoplasmático. O RNA total foi isolado de plântulas de *Arabidopsis* de 15 dias tratadas com PEG (10% p/v) ou tunicamicina (2,5µg/mL) por 8 h (para PEG um tempo adicional de 24h foi usado). Meio MS ¼ foi usado como controle para PEG e MS ¼ acrescido de DMSO como controle para tunicamicina. O nível de transcritos dos genes selecionados, como indicado, foi quantificado por qRT-PCR. A expressão gênica foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$ e o gene da *Actina* foi utilizado como controle endógeno. *CNX* e *RAB18* são genes marcadores de estresse no retículo endoplasmático e estresse

osmótico, respectivamente. Col-0 denota a linhagem selvagem enquanto *ataf1* a linhagem *ataf1-2*, nocaute para o gene *ATAF1*. As barras indicam o erro padrão e os asteriscos indicam significância estatística pelo teste-t ($p < 0,05$, $n = 4$). (A) Indução de CNX por tratamento com tunicamicina. (B) Indução de *RABI8* por tratamento com PEG. (C) Expressão de *ATAF1* em plantas Col-0 em resposta aos tratamentos com PEG e tunicamicina.

Uma possível interação do gene *ATAF1* com a via de morte celular induzida por estresses no RE e osmótico foi também avaliada por genética reversa. Para isso, inicialmente foi identificado um mutante (*ataf1-2*) com inserção de T-DNA no gene *ATAF1* (Salk_057618). SALK_057618 contém uma inserção de T-DNA no terceiro éxon do gene *ATAF1* e será aqui designado como *ataf1-2*, conforme previamente reportado (LU *et al.*, 2007; JENSEN *et al.*, 2007; WANG *et al.* 2009) (Figura 14A). Plantas mutantes homozigotas foram identificadas por genotipagem com primers específicos para *ATAF1* que flanqueiam os locais de inserção do T-DNA (Tabela 1) e uma linhagem foi selecionada para os experimentos subsequentes (Figura 14B). Por meio de qRT-PCR, foi determinado uma redução de 75% no acúmulo de transcritos de *ATAF1* no mutante *ataf1-2* (Figura 14C). A expressão de componentes da via de morte celular foi então avaliada em plantas Col-0 e *ataf1-2*.

A Figura 15 representa o acúmulo de transcritos dos genes *NRP-1* e *ANAC036* antes e após o tratamento com PEG e TUN em plantas Col-0 e *ataf1-2*. Foi demonstrado previamente que tanto *NRP-1* quanto *ANAC036* são induzidos por estresses osmótico e do retículo endoplasmático (REIS *et al.*, 2016). Nas condições utilizadas pelos estudos anteriores, *NRP-1* teve seu pico máximo de indução por PEG após 12h de tratamento e, por TUN, após 6h de tratamento, enquanto *ANAC036* apresentou uma cinética de indução mais tardia. Nas condições aqui utilizadas, não foi possível observar, em plantas Col-0, alteração na expressão de *ANAC036* e, no caso de *NRP-1*, foi observado um aumento no acúmulo de transcritos apenas após o tratamento com tunicamicina. É possível que nas condições do presente experimento o tempo de duração dos estresses acoplado à intensidade dos mesmos não tenham sido suficientes para induzir efetivamente a expressão desses genes em plantas do genótipo Col-0.

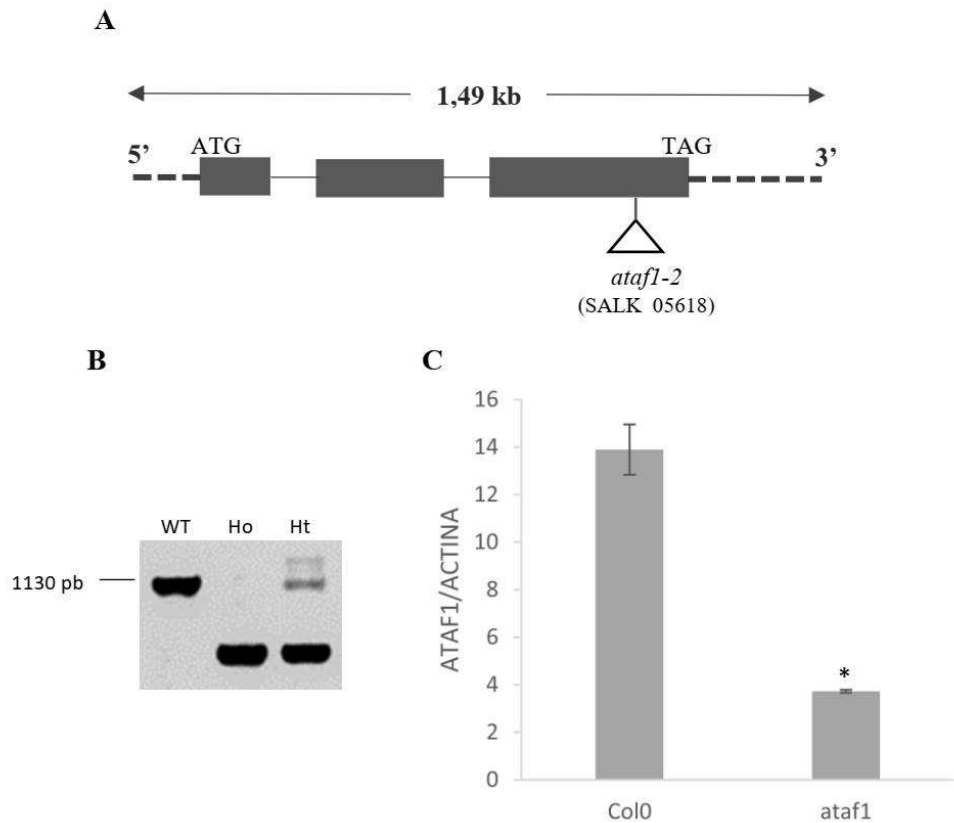


Figura 14. Confirmação de nocaute de ATAF1. (A) A ilustração indica o local da inserção do T-DNA no gene *ATAF1* (At1g01720). O triângulo indica o sítio de inserção do T-DNA no terceiro exon. Retângulos sólidos indicam os exons, linhas sólidas, os introns e as linhas tracejadas indicam as regiões 5' e 3' não traduzidas. (B) Genotipagem de *ataf1-2* (Salk_057618). A genotipagem de homozigotos foi feita utilizando oligonucleotídeos gene-específicos e o oligonucleotídeo específico para o T-DNA. WT, linhagem selvagem – Col-0; Ho, homozigoto; Ht, heterozigoto. (C) O mutante *ataf1-2* acumula quantidade inferior de transcritos para ATAF1. O acúmulo do mRNA de *ATAF1* foi determinado por qRT-PCR em plantas selvagens (Col-0) e linhagem mutante por inserção do T-DNA (*ataf1-2*). O RNA total foi isolado de plântulas de *Arabidopsis* de 15 dias da linhagem Col0 ou *ataf1-2*. O nível de transcritos dos genes selecionados, como indicado, foi quantificado por qRT-PCR. A expressão absoluta dos genes foi verificada pelo método $2^{-\Delta C_t}$ e o gene da *Actina* foi utilizado como controle endógeno. As barras indicam o erro padrão e os asteriscos indicam significância estatística pelo teste-t ($p < 0,05$, $n = 4$).

Entretanto, no mutante *ataf1-2*, ANAC036 foi induzido por ambos os tratamentos, enquanto *NRP1* foi induzido apenas pelo tratamento com TUN, apesar de ter apresentado uma tendência ao aumento da expressão após o tratamento com PEG. A expressão basal de *NRP1* e *ANAC036* também foi significativamente superior no mutante *ataf1-2* quando comparado com Col-0 (Figura 15). Estes resultados implicam ATAF1 como um potencial regulador negativo da via de morte celular mediada por proteínas NRP-DCDs, embora estudos adicionais sejam necessários a fim de comprovar essa hipótese.

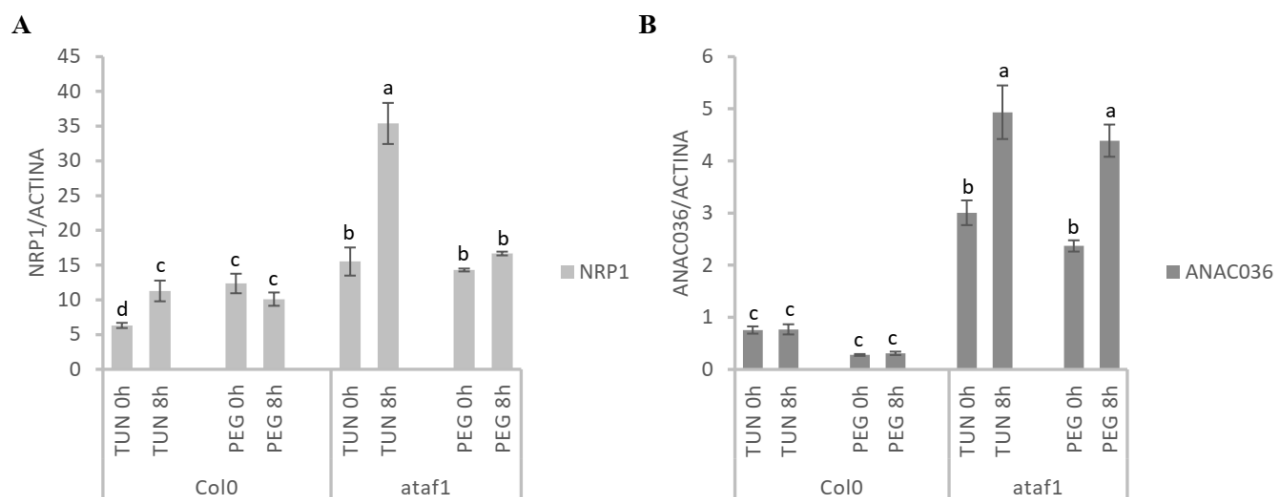


Figura 15. Expressão de *NRP1* e *ANAC036* em resposta a estresse osmótico e estresse no retículo endoplasmático.

O RNA total foi isolado de plântulas de *Arabidopsis* de 15 dias tratadas com PEG (10% p/v) ou tunicamicina (2,5µg/mL) por 8 h. Meio MS ¼ foi usado como controle para PEG e MS ¼ acrescido de DMSO como controle para tunicamicina. O nível de transcritos dos genes selecionados, como indicado, foi quantificado por qRT-PCR. A expressão gênica foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta Ct}$ e o gene da *Actina* foi utilizado como controle endógeno. Col-0 denota a linhagem selvagem enquanto *ataf1* a linhagem *ataf1-2*, nocaute para o gene *ATAF1*. Foi realizada uma ANOVA one-way com pós teste de Scott-Knott. As barras indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferente e letras iguais valores que não diferem significativamente ($p < 0,05$, $n = 4$). (A) Expressão de *NRP1* em plantas Col-0 e *ataf1-2* em resposta aos tratamentos com PEG e tunicamicina. (B) Expressão de *ANAC036* em plantas Col-0 e *ataf1-2* em resposta aos tratamentos com PEG e tunicamicina.

4.5. ATAF2 como possível componente da via de morte mediada por NRPs

Os resultados obtidos ao longo do trabalho forneceram indícios de que ATAF1 estaria atuando não como um integrante da via de morte mediada por NRPs, mas como um regulador negativo da mesma. As análises de bioinformática indicam que os componentes em *Arabidopsis thaliana* mais filogeneticamente relacionados a GmNAC30 são os fatores de transcrição ANAC102 e ATAF2 da família SNAC-A (ATAF).

Sendo ATAF2 mais bem caracterizado do que ANAC102, inicialmente, foi verificado se ATAF2 era induzido resposta aos tratamentos com tunicamicina e PEG em plântulas de *Arabidopsis* das linhagens Col-0 e *ataf1-2*. Em plântulas da linhagem Col-0 foi possível observar a indução de *ATAF2* em resposta a ambos os estresses, consistente com o perfil de expressão gênica de integrantes da via de morte celular mediada por NRPs (Figura 16). Em *ataf1-2*, entretanto, observa-se uma redução na expressão basal do gene *ATAF2* comparada com Col-0, o que está de acordo com precedentes na literatura

(JENSEN *et al.*, 2013). No entanto, a expressão de *ATAF2* induzida por PEG e TUN foi significativamente superior em *ataf1-2* comparada a Col-0 (Figura 16). Estes resultados substanciam o argumento de que *ATAF2* possa ser ortólogo de *GmNAC030*, uma vez que foi demonstrada que sua expressão induzida por estresses é controlada negativamente por *ATAF1*.

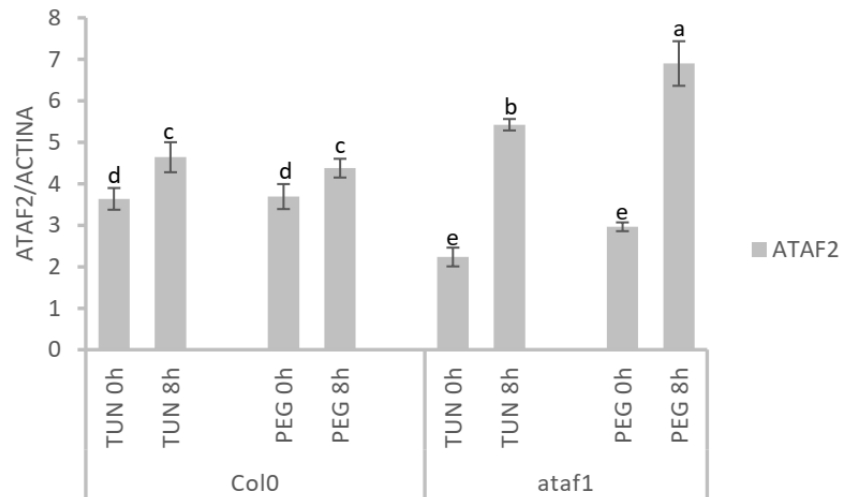


Figura 16. *ATAF2* é induzido por estresse osmótico e no retículo endoplasmático. O RNA total foi isolado de plântulas de *Arabidopsis* de 15 dias tratadas com PEG (10% p/v) ou tunicamicina (2,5µg/mL) por 8 h. Meio MS ¼ foi usado como controle para PEG e MS ¼ acrescido de DMSO como controle para tunicamicina. O nível de transcritos dos genes selecionados, como indicado, foi quantificado por qRT-PCR. A expressão gênica foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta C_t}$ e o gene da *Actina* foi utilizado como controle endógeno. Col-0 denota a linhagem selvagem enquanto *ataf1* a linhagem *ataf1-2*, nocaute para o gene *ATAF1*. Foi realizada uma ANOVA one-way com pós teste de Scott-Knott. As barras indicam o erro padrão. Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferente e letras iguais valores que não diferem significativamente ($p < 0,05$, $n = 4$).

ATAF2, de forma similar ao observado para *ATAF1*, quando expresso transientemente em folhas de *Nicotiana benthamiana* e avaliado por microscopia confocal, localiza-se no núcleo (Figura 17). Esse fator de transcrição, diferentemente dos outros componentes do grupo SNAC-A (*ATAF*), tem sido associado principalmente a respostas a estresses bióticos. O presente estudo fornece evidências de que esse fator de transcrição possa estar atuando também nos mecanismos de defesa de plantas em resposta a estresses abióticos, como destaque da importância e abrangência da ação dos fatores de transcrição que compõem o subgrupo SNAC-A. No entanto, experimentos complementares são necessários a fim de compreender melhor o envolvimento de *ATAF2* na via de sinalização mediada por proteínas NRPs em *Arabidopsis*.

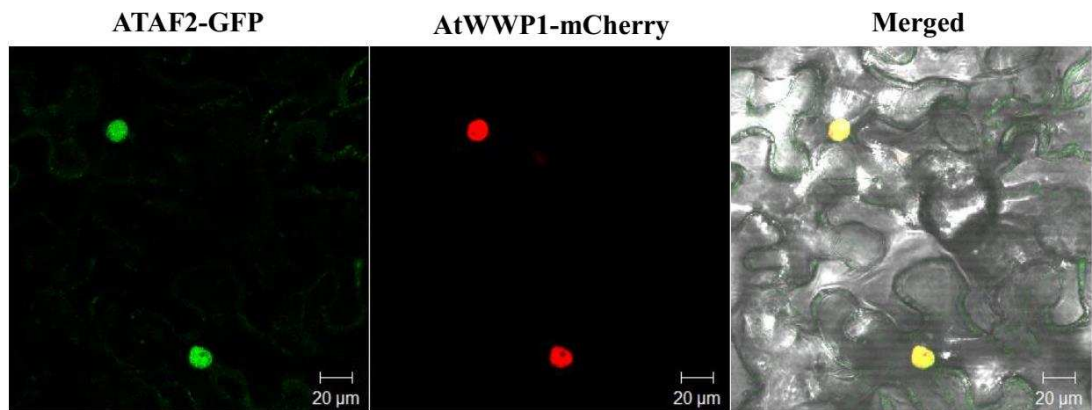


Figura 17. Localização subcelular ATAF2. Folhas de *N. benthamiana* foram infiltradas com *Agrobacterium* transformada com a construção 35S:ATAF2-GFP. A localização subcelular da proteína foi monitorada por microscopia confocal 72h após infiltração. A co-localização da proteína fusionada ao GFP com o marcador nuclear AtWWP1-mCherry é mostrada na imagem mesclada (merged). Barras de escala = 20µm.

5. CONCLUSÃO

GmNAC30 é um fator de transcrição do tipo NAC pertencente a subfamília SNAC-A, que inclui membros responsivos a múltiplos estresses. Aqui, foi mostrado por análises *in silico*, que existem homólogos de GmNAC30 em várias espécies vegetais, demonstrando a importância desse fator de transcrição e da via na qual ele está envolvido. Além disso, a fim de delimitar a subfamília SNAC-A (ATAF) em soja, os genes NAC de soja foram comparados com os genes da subfamília SNAC-A de *Arabidopsis*. Foi observada uma expansão da subfamília SNAC-A de soja, que apresentou 4 membros a mais que em *Arabidopsis*, totalizando 11 membros. Possivelmente, esta expansão está relacionada à seleção artificial a que tem sido submetidas variedades de soja, como espécie cultivável de alto significado econômico, exercendo uma pressão seletiva para duplicação e manutenção de genes associados a traços agrônomicos relevantes, como tolerância a estresses do meio ambiente.

Avaliando a expressão dos integrantes dessa subfamília em soja que se agruparam mais próximos a GmNAC30 em resposta a indução de estresses osmótico, do RE e estresse biótico, constatou-se o envolvimento desses fatores de transcrição na resposta a estresses múltiplos. Foi observado um padrão de indução por PEG e TUN similar para os genes dessa subfamília que em soja se apresentam duplicados; porém os pares exibiram diferenças sutis de indução por AS, indicando que devem exibir funções parcialmente sobrepostas, mas não absolutamente idênticas.

Neste trabalho, foram observadas ainda evidências de que *ATAF1*, diferentemente do indicado na literatura, não atua como ortólogo de *GmNAC30*. Essa hipótese é sustentada uma vez que não foi verificado, por ensaio de duplo-híbrido em leveduras, interação entre *ATAF1* e *ANAC036*, o ortólogo de *GmNAC081*; além disso, ao contrário de *GmNAC30*, *ATAF1* não foi induzido em resposta a tratamento com TUN. Entretanto, foi observado que *ATAF1* atua como um regulador negativo da via de morte celular mediada por NRPs, visto que tanto a expressão basal quanto a expressão induzida por PEG e TUN dos genes *NRP-1* e *ANAC036*, componentes da via de morte celular, foi superior no mutante *ataf1-2* (mutante por inserção de T-DNA no gene *ATAF1*) do que em Col-0.

As análises *in silico* aqui realizadas apontaram para *ATAF2* ou *ANAC102* como os mais prováveis ortólogos de *GmNAC30*. Sendo *ATAF2* o membro mais bem

caracterizado, foi avaliada a expressão deste em resposta aos estresses osmóticos e do RE, sendo observado a indução desse fator de transcrição em resposta a ambos os estresses. Esses dados implicaram *ATAF2* como um possível integrante da via de morte celular mediada por proteínas NRPs, no entanto mais estudos são necessários a fim de verificar essa hipótese.

Coletivamente, os dados obtidos permitiram compreender melhor a distribuição da subfamília SNAC-A no reino vegetal e demonstrar a importância dos fatores de transcrição que a compõem na adaptabilidade e resposta de plantas a múltiplos estresses. Além disso, os resultados forneceram evidências de uma nova camada de regulação da via de morte celular mediada por NRPs envolvendo o fator de transcrição *ATAF1*. Por fim, as informações obtidas aqui destacaram *ATAF2* como um possível membro da via de morte mediada por NRPs.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aida M, Ishida T, Fukaki H, Fujisawa H, Tasaka M.. Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell*. 1997; 9(6): 841-57.
- Allu AD, Brotman Y, Xue GP, Balazadeh S. Transcription factor ANAC032 modulates JA/SA signalling in response to *Pseudomonas syringae* infection. *EMBO reports*. 2016.
- Alves MS, Reis PAB, Dadalto SP, Faria JAQA, Fontes EPB, Fietto LG. A novel transcription factor, ERD15 (Early Responsive to Dehydration 15), connects endoplasmic reticulum stress with an osmotic stress-induced cell death signal. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286(22): 20020–30.
- Calil IP. Characterization of transcriptionally active atwwp1 nuclear bodies that confer partial immunity against begomoviruses. 2017. 162f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2017.
- Carvalho CM, Fontenelle MR, Florentino LH, Santos AA, Zerbini FM, Fontes EP. A novel nucleocytoplasmic traffic GTPase identified as a functional target of the bipartite geminivirus nuclear shuttle protein. *The Plant Journal*. 2008; 55(5): 869-80.
- Carvalho HH, Silva PA, Mendes GC, Brustolini OJ, Pimenta MR, Gouveia BC, Valente MA, Ramos HJ, Soares-Ramos JR, Fontes EP. The endoplasmic reticulum binding protein BiP displays dual function in modulating cell death events. *Plant Physiol*. 2014; 164(2): 654-70.
- Chai C, Wang Y, Joshi T, Valliyodan B, Prince S, Michel L, Xu D, Nguyen HT. Soybean transcription factor ORFeome associated with drought resistance: a valuable resource to accelerate research on abiotic stress resistance. *BMC Genomics*. 2015; 16(596).
- Cheng CY, Krishnakumar V, Chan AP, Thibaud-Nissen F, Schobel S, Town CD. Araport11: a complete reannotation of the Arabidopsis thaliana reference genome. *Plant J*. 2017; 89(4): 789-804.
- Christianson JA, Dennis ES, Llewellyn DJ, Wilson IW. ATAF NAC transcription factors: Regulators of plant stress signaling. *Plant Signaling & Behavior*. 2010; 5(4): 428-32.
- Christianson JA, Wilson IW, Llewellyn DJ, Dennis ES. The Low-Oxygen-Induced NAC Domain Transcription Factor ANAC102 Affects Viability of Arabidopsis Seeds following Low-Oxygen Treatment. *Plant Physiology*. 2009; 149(4): 1724-38.
- Chung PJ, Jung H, Choi YD, Kim JK. Genome-wide analyses of direct target genes of four rice NAC-domain transcription factors involved in drought tolerance. *BMC Genomics*. 2018; 19(40): 1-17.
- Collinge M, Boller T. Differential induction of two potato genes, Stprx2 and StNAC, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding. *Plant Mol Biol*. 2001; 46(5): 521-9.

Conab – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira – grãos. Safra 2017/2018, nono levantamento, jun. 2017. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>>. Acesso em: 16 junho 2018.

Costa MD, Reis PA, Valente MA, Irsigler AS, Carvalho CM, Loureiro ME, Aragão FJ, Boston RS, Fietto LG, Fontes EP. A new branch of endoplasmic reticulum stress signaling and the osmotic signal converge on plant-specific asparagine-rich proteins to promote cell death. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008; 283(29): 20209-19.

Delessert C, Kazan K, Wilson IW, Van Der Straeten D, Manners J, Dennis ES, Dolferus R. The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 2005; 43(5): 745-57.

Dong Y, Wang BH, Wang YZ. Functional characterization of the orthologs of *AtNST1/2* in *Glycine soja* (*Fabaceae*) and the evolutionary implications. *Journal of Systematics and Evolution*. 2013; 51 (6): 693–703.

Doyle JJ, Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochem Bull*. 1987; 19: 11-15.

Edgar, RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32: 1792-97.

Fang Y, You J, Xie K, Xie W, Xiong L. Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. *Mol Genet Genomics*. 2008; 280: 547-63.

Faria JAQA, Reis PAB, Reis MTB, Rosado GL, Pinheiro GL, Mendes GC, Fontes EPB. The NAC domain-containing protein, GmNAC6, is a downstream component of the ER stress- and osmotic stress-induced NRP-mediated cell-death signaling pathway. *BMC Plant Biology*. 2011; 11(129): 1-14.

Fehr WR, Caviness CE. Stages of soybean development. Ames:Iowa State University of Science and Technology (Special Report, 80) 11p., 1977

Gahlaut V, Jaiswal V, Kumar A, Gupta PK. Transcription factors involved in drought tolerance and their possible role in developing drought tolerant cultivars with emphasis on wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*. 2016; 129: 2019-42.

Garapati P, Xue GP, Munné-Bosch S, Balazadeh S. Transcription Factor ATAF1 in *Arabidopsis* Promotes Senescence by Direct Regulation of Key Chloroplast Maintenance and Senescence Transcriptional Cascades. *Plant Physiology*. 201; 168(3): 1122-39.

Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P. Endoplasmic Reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013; 5(3).

Guo Y, Gan S. AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal*, 2006; 46(4): 601-12.

Hao YJ, Wei W, Song QX, Chen HW, Zhang YQ, Wang F, Zou HF, Lei G, Tian AG, Zhang WK, Ma B, Zhang JS, Chen SY. Soybean NAC transcription factors promote

abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. *The Plant Journal*. 2011; 68: 302-13.

Hatsugai N, Yamada K, Goto-Yamada S, Hara-Nishimura I. Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Frontiers in Plant Science*. 2015; 6:234.

Hickman R, Hill C, Penfold CA, Breeze E, Bowden L, Moore JD, Zhang P, Jackson A, Cooke E, Bewicke-Copley F, Mead A, Beynon J, Wild DL, Denby KJ, Ott S, Buchanan-Wollaston V. A local regulatory network around three NAC transcription factors in stress responses and senescence in *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*. 2013; 75(1): 26-39.

Howell SH. Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2013; 64: 477-99.

Huh SU, Lee SB, Kim HH, Paek KH. ATAF2, a NAC Transcription Factor, Binds to the Promoter and Regulates NIT2 Gene Expression Involved in Auxin Biosynthesis. *Mol. Cells*. 2012; 34(3): 305-13.

Irsigler AS, Costa MD, Zhang P, Reis PA, Dewey RE, Boston RS, Fontes EP. Expression profiling on soybean leaves reveals integration of ER- and osmotic-stress pathways. *BMC genomics*. 2007; 8(431).

Jensen MK, Kjaersgaard T, Nielsen MM, Galberg P, Petersen K, O'shea C, Skriver K. The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure–function relationships and determinants of ANAC019 stress signaling. *Biochem. J*. 2010; 426: 183-96.

Jensen MK, Lindemose S, de Masi F, Reimer JJ, Nielsen M, Perera V, Workman CT, Turck F, Grant MR, Mundy J, Petersen M, Skriver K. ATAF1 transcription factor directly regulates abscisic acid biosynthetic gene NCED3 in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Open Bio*. 2013; 29(3):321-27.

Kim HJ, Nam HG, Lim PO. Regulatory network of NAC transcription factors in leaf senescence. *Current Opinion in Plant Biology*. 2016; 33:48–56.

Kim SY, Kim SG, Kim YS, Seo PJ, Bae M, Yoon HK, Park CM. Exploring membrane-associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Research*. 2007; 35(1): 203-13.

Kim YS, Kim SG, Park JE, Park HY, Lim MH, Chua NH, Park CM. A membrane-bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2006; 18(11): 3132-44.

Kunieda T, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Takeda S, Aida M, Tasaka M, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I. NAC Family Proteins NARS1/NAC2 and NARS2/NAM in the Outer Integument Regulate Embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2008; 20(10): 2631-42.

Le DT, Nishiyama R, Watanabe Y, Mochida K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LSP. Genome-Wide Survey and Expression Analysis of the Plant-Specific NAC Transcription Factor Family in Soybean During Development and Dehydration Stress. *DNA Research*. 2011; 18: 263–76.

- Li S, Wang N, Ji D, Xue Z, Yu Y, Jiang Y, Liu J, Liu Z, Xiang F. Evolutionary and Functional Analysis of Membrane-Bound NAC Transcription Factor Genes in Soybean. *Plant Physiol.* 2016; 172(3): 1804-1820.
- Liu JX, Howell SH. Endoplasmic Reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *Plant Cell.* 2010; 22(9): 2930-42.
- Lu PL, Chen NZ, An R, Su Z, Qi BS, Ren F, Chen J, Wang XC. A novel drought-inducible gene, ATAF1, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in Arabidopsis. *Plant Mol Biol.* 2007; 63(2): 289-305.
- Ma S, Niu H, Liu C, Zhang J, Hou C, Wang D. Expression Stabilities of Candidate Reference Genes for RT-qPCR under Different Stress Conditions in Soybean. *PLoS One.* 2013; 8(10).
- Mahmood K, El-Kereamy A, Kim SH, Nambara E, Rothstein SJ. ANAC032 Positively Regulates Age-Dependent and Stress-Induced Senescence in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 2016a; 57(10): 2029-2046.
- Mahmood K, Xu Z, El-Kereamy A, Casaretto JA, Rothstein SJ. The Arabidopsis Transcription Factor ANAC032 Represses Anthocyanin Biosynthesis in Response to High Sucrose and Oxidative and Abiotic Stresses. *Front Plant Sci.* 2016b; 7: 1548.
- Melo BP. Revisitando a superfamília NAC no genoma da soja: identificação e caracterização de novos membros. 2016. 72f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2016.
- Mendes GC, Reis PA, Calil IP, Carvalho HH, Aragão FJ, Fontes EP. GmNAC30 and GmNAC81 integrate the endoplasmic reticulum stress- and osmotic stress-induced cell death responses through a vacuolar processing enzyme. *PNAS.* 2013; 110(48): 19627-32.
- Mitsuda N, Iwase A, Yamamoto H, Yoshida M, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M. NAC transcription factors, NST1 and NST3, are key regulators of the formation of secondary walls in woody tissues of Arabidopsis. *The Plant Cell.* 2007; 19: 270-80.
- Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M. The NAC Transcription Factors NST1 and NST2 of Arabidopsis Regulate Secondary Wall Thickenings and Are Required for Anther Dehiscence. *The Plant Cell.* 2005; 17: 2993-3006.
- Muhire BM, Varsani A, Martin DP. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PloS ONE.* 2014; 9(9).
- Murashige TE, Skoog FA. Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum.* 1962; 15: 473–97.
- Nakashima K, Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A nuclear gene, erdl, encoding a chloroplast-targeted Clp protease regulatory subunit homolog is not only induced by water stress but also developmentally up-regulated during senescence in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 1997; 12(4): 851-61.

Nakashima K, Takasaki H, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012; 1819: 97-103.

Negi S, Tak H, Ganapathi TR. Native vascular related NAC transcription factors are efficient regulator of multiple classes of secondary wall associated genes in banana. *Plant Science*. 2017; 265: 70-86.

Nuruzzaman M, Manimekalai R, Sharoni AM, Satoh K, Kondoh H, Ooka H, Kikuchi S. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. *Gene*. 2010; 465: 30-44.

Olsen AN, Ernst HA, Leggio LL, Skriver K. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse. *TRENDS in Plant Science*. 2005; 10(2): 79-87.

Peng H, Zhao J, Neff MM. ATAF2 integrates Arabidopsis brassinosteroid inactivation and seedling photomorphogenesis. *Development*. 2015; 142: 4129-38.

Pimenta MR, Silva PA, Mendes GC, Alves JR, Caetano HD, Machado JP, Brustolini OJ, Carpinetti PA, Melo BP, Silva JC, Rosado GL, Ferreira MF, Dal-Bianco M, Picoli EA, Aragao FJ, Ramos HJ, Fontes EP. The Stress-Induced Soybean NAC Transcription Factor GmNAC81 Plays a Positive Role in Developmentally Programmed Leaf Senescence. *Plant Cell Physiol*. 2016; 57(5): 1098-114.

Pinheiro GL, Marques CS, Costa MDBL, Reis PAB, Alves MS, Carvalho CM, Fietto LG, Fontes EPB. Complete inventory of soybean NAC transcription factors: Sequence conservation and expression analysis uncover their distinct roles in stress response. *Gene*. 2009; 444: 10-23.

Puranik S, Sahu PP, Srivastava PS, Prasad M. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 2012; 17(6): 369-81.

Reis PAB, Carpinetti PA, Freitas PPJ, Santos EGD, Camargos LF, Oliveira IHT, Silva JCF, Carvalho HH, Dal-Bianco M, Ramos JRLS, Fontes EPB. Functional and regulatory conservation of the soybean ER stress-induced DCD/NRP mediated cell death signaling in plants. *BMC Plant Biology*. 2016; 16(156): 1-19.

Reis PAB, Fontes EPB. N-rich protein (NRP)-mediated cell death signaling: a new branch of the ER stress response with implications for plant biotechnology. *Plant Signaling & Behavior*. 2012; 7(6): 628-632.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003; 19: 1572-74.

Ruberti C, Brandizzi F. Conserved and plant-unique strategies for overcoming endoplasmic reticulum stress. *Frontiers in Plant Science*. 2014; 5(69).

Sablowski RW, Meyerowitz EM. A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell*. 1998; 92: 93-103.

Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ, Cheng J *et al.* Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*. 2010; 463: 178-83.

Selth LA, Dogra SC, Rasheed MS, Healy H, Randles JW, Rezaian MA. A NAC Domain Protein Interacts with Tomato leaf curl virus Replication Accessory Protein and Enhances Viral Replication. *The Plant Cell*. 2005; 17(1): 311-325.

Shiriga K, Sharma R, Kumar K, Yadav SK, Hossain F, Thirunavukkarasu N. Genome-wide identification and expression pattern of drought responsive members of the NAC family in maize. *Meta Gene*. 2014; 2: 407-17.

Silva PA, Silva JC, Caetano HD, Machado JP, Mendes GC, Reis PA, Brustolini OJ, Dal-Bianco M, Fontes EP. Comprehensive analysis of the endoplasmic reticulum stress response in the soybean genome: conserved and plant-specific features. *BMC Genomics*. 2015; 16: 783.

Simpson SD, Nakashima K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous Arabidopsis gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J*. 2003; 33(2): 259-70.

Souer E, van Houwelingen A, Kloos D, Mol J, Koes R. The *no apical meristem* gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell*. 1996; 85(2): 159-70.

Takasaki H, Maruyama K, Takahashi F, Fujita M, Yoshida T, Nakashima K, Myouga F, Toyooka K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. SNAC-As, stress-responsive NAC transcription factors, mediate ABA-inducible leaf senescence. *Plant J*. 2015; 84(6): 1114-23.

Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Simpson S D, Fujita Y, Maruyama K, Fujita M, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Isolation and Functional Analysis of Arabidopsis Stress-Inducible NAC Transcription Factors That Bind to a Drought-Responsive cis-Element in the early responsive to dehydration stress 1 Promoter. *The Plant Cell*. 2004; 16: 2481-98.

Tran LSP, Nishiyama R, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Potential utilization of NAC transcription factors to enhance abiotic stress tolerance in plants by biotechnological approach. *GM Crops*. 2010; 1: 32-39.

Tweneboah S, Oh S-K. Biological roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in solanaceous crops. *J Plant Biotechnol*. 2017; 44: 1-11.

Wan S, Jiang L. Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants. *Protoplasma*. 2016; 253: 753-764.

Wang D, Yu Y, Liu Z, Li S, Wang Z, Xiang F. Membrane-bound NAC transcription factors in maize and their contribution to the oxidative stress response. *Plant Science*. 2016; 250: 30-39.

Wang X, Basnayake BM, Zhang H, Li G, Li W, Virk N, Mengiste T, Song F. The Arabidopsis ATAF1, a NAC Transcription Factor, is a Negative Regulator of Defense Responses Against Necrotrophic Fungal and Bacterial Pathogens. *Mol Plant Microbe Interact.* 2009; 22(10): 1227-38.

Wang X, Culver JN. DNA binding specificity of ATAF2, a NAC domain transcription factor targeted for degradation by Tobacco mosaic virus. *BMC Plant Biology.* 2012; 12(157).

Wickham H, Chang W. *ggplot2: An implementation of the Grammar of Graphics.* R package version 0.7, 2008. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=ggplot2>.

Wu Y, Deng Z, Lai J, Zhang Y, Yang C, Yin B, Zhao Q, Zhang L, Li Y, Yang C, Xie Q. Dual function of Arabidopsis ATAF1 in abiotic and biotic stress responses. *Cell Res.* 200; 19(11): 1279-90.

Xie Q, Frugis G, Colgan D, Chua NH. Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.* 2000; 14(23): 3024-36.